

中華醫事科技大學生物科技研究所



碩士論文

乳酸菌對抗陰道病原菌的能力分析

Inhibitory Analysis of Lactic Acid Bacteria on Vaginal
Pathogens

研究生：江冠勳

指導教授：呂英震 博士

中華民國 一 百 年 三 月

中華醫事科技大學
碩士班研究生

論文口試委員會審定書

醫事技術系暨研究所 碩士班 江冠勳 君所提之論文 乳酸菌對抗陰道病原菌的能力分析，經本委員會審議，符合碩士資格標準。

論文口試委員會 召集人 _____ (簽章)

委 員 _____ (簽章)

_____ (簽章)

_____ (簽章)

_____ (簽章)

_____ (簽章)

所 長 _____ (簽章)

中華民國 一 百 年 一 月 十 一 日



中華醫事科技大學 碩士論文全文電子檔案上網授權書

本授權書所授權之論文全文電子檔案，為本人於中華醫事科技大學，撰寫之碩士學位論文。(以下請擇一勾選)

- ☐ 同意立即開放
- ☐ 同意一年後開放，原因是：

- ☐ 同意二年後開放，原因是：

- ☐ 同意三年後開放，原因是：

以非專屬、無償授權中華醫事科技大學圖書館和國家圖書館。基於推動「資源共享、互惠合作」之理念，於回饋本校與社會作為學術研究目的之用，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、學位論文全文系統、網路或其他各種方法收錄、重製、與發行，或再授權他人以各種方法重製與利用，以提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

研究生： 江冠勳

論文名稱： 乳酸菌對抗陰道病原菌的能力分析

指導教授： 呂英震

系所： 生物科技研究所生醫產業科技組

學號： A96010194

日期： 民國 一 百 年 三 月 二十 二 日

備註：

1. 本授權書請填寫並以**黑色筆**親筆簽名後，裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
2. 讀者基於非個人營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法有關規定辦理。

致謝

本論文得以順利完成，要感謝在這段時間陪我歷經每一段過程的人，首先誠摯感謝指導教授呂英震博士的多年來的悉心指導與教誨，讓我在實驗遇到困境時會引領我去突破自己的困境，而能一點一滴的架構出觀念，且於撰寫論文及口試期間撥冗批閱及斧正論文，使本論文能更趨完備，除了能夠完成學業外，也學習到不少待人處事與解決問題的能力，於此獻上最誠摯的謝意。

同時，感謝美麗的助理惠如在收集實驗資料時，義不容辭的幫助以及學弟大熊、冠偉、阿先和豬仔實驗上的協助與球技上的切磋，還有學妹小魚、小緋、西瓜、小孟、小四、欣容、大媽、韋璇，因為有你們才讓實驗室生活不至於太過乏味，讓我在研究生涯中增添許多難忘的回憶，因為有你們的幫忙與協助，一起經歷每一個實驗，才能完成這篇研究。

最後，感謝我的母親、舅舅、姐姐和姊夫所給予的支持與關懷，讓我在學習過程中無後顧之憂，還有我的女友玟蕙在我最需要幫忙時給予鼓勵並且分享我的喜怒哀樂，在此希望將一切榮耀與成就呈獻給我最深愛的家人。

中文摘要

在近代的社會中，細菌性陰道炎是現代女性最常遇到的健康問題之一，加上台灣氣候潮濕悶熱，私密處困擾應該更加普遍。徹底清潔的觀念只會讓陰道感染更加惡化，即便以抗生素治療，不僅效果不彰且副作用大，覆發率更高達5成。乳酸菌是生殖道中的優勢共生菌種，藉由維持酸性環境、分泌抗菌物質來抑制陰道病原菌種生長或粘附在上皮組織中。本篇論文之目的就是利用乳酸菌所產的乳酸、 H_2O_2 、細菌素以及生物膜來對抗陰道病原菌的能力分析。

此實驗篩選出9種乳酸菌菌種共有82株菌。實驗結果顯示乳酸菌的pH值在3.6~4.55之間 (24小時)、3.5~4.5 (48小時)，酸度在0.198~0.045%之間。 H_2O_2 和乳酸對 *Candida albicans*、*Gardnerella vaginalis* 和 *Escherichia coli* 的MIC試驗， H_2O_2 對 *Candida albicans* 的最小抑菌濃度為0.116mM，對 *Gardnerella vaginalis* 的最小抑菌濃度為0.029mM，對 *Escherichia coli* 的最小抑菌濃度為0.0116mM，乳酸對 *Candida albicans* 的最小抑菌濃度為85%，對 *Gardnerella vaginalis* 的最小抑菌濃度為4.25%，對 *Escherichia coli* 的最小抑菌濃度為2.125%。

最後在所有抗菌試驗中發現 *Lactobacillus reuteri* 此菌種針對 *Candida albicans* 和 *Gardnerella vaginalis* 抑制能力效果最佳；*Lactobacillus rhamnosus* 對 *Escherichia coli* 的抑制能力最好。

關鍵字：細菌性陰道炎、*Lactobacillus Reuteri*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Candida albicans*、*Gardnerella vaginalis*、*Escherichia coli*

Abstract

In modern society, modern women bacterial vaginosis is the most commonly encountered health problems , in addition Taiwan climate moist sultry, the feminine private parts problems should be more common. The traditional concept thorough cleaning will only worsen vaginal infections, even with antibiotic treatment, and side effects is not only ineffective, the recurrence rate as high as 50 percent. Lactic acid bacteria are the advantages of the genital tract symbiotic bacteria, by maintaining the acidic environments, the secretion of antimicrobial substances to inhibit the growth of vaginal pathogenic bacteria species or adhesion in epithelial tissues. The purpose of this thesis is the use of lactic acid , H_2O_2 , bacteriocin and the biofilm produced by lactic acid bacteria against the ability of vaginal pathogens.

This experiment screened 9 species of 82 strains of lactic acid bacteria strains. The results showed that lactic acid pH value between 3.6 ~ 4.55 (24h), 3.5 ~ 4.5 (48 h), acidity in the 0.198 ~ 0.045%. H_2O_2 and lactic acid on *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Escherichia coli* the minimum inhibitory concentration (MIC) test, H_2O_2 on the minimum inhibitory concentration of *Candida albicans* to 0.116mM, on the minimum inhibitory concentration of *Gardnerella vaginalis* as 0.029mM, of *Escherichia coli* minimum inhibitory concentration 0.0116mM, lactic acid on *Candida albicans* of the minimum inhibitory concentration of 85%, of *Gardnerella vaginalis* in the minimum inhibitory concentration of 4.25%, on the *Escherichia coli* minimum inhibitory concentration of 2.125%. Finally, all antimicrobial tests found that this strain *Lactobacillus reuteri* for *Candida albicans* and *Gardnerella vaginalis* rejection the best. *Lactobacillus rhamnosus* against *Escherichia coli* is the ability to inhibit the best.

Keyword: *bacterial vaginosis, Lactobacillus Reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Escherichia coli*

論文目錄

論文口試委員會審定書	i
授權書	ii
致謝	iii
中文摘要	iv
Abstract.....	v
論文目錄	vi
圖表目錄	viii
第一章、緒論	1
1.1.研究背景	1
1.2.研究動機與目的	5
第二章、相關議題探討	6
2.1.陰道炎與主要致病菌種	6
2.1.1.陰道炎之種類	8
2.1.2.陰道炎主要致病菌種	11
2.2.乳酸菌	14
2.2.1.乳酸菌基本特性	16
2.2.2.各乳酸菌屬主要特性簡述	18
2.2.3.乳酸菌在人體的生理活性	23
2.2.4.乳酸菌抑菌機制	26
第三章、材料與方法	33
3.1.材料	33
3.2.實驗方法	34
3.2.1.篩菌試驗	34
3.2.2.生物膜	35

3.2.3.酸度	36
3.2.4.產 H ₂ O ₂ 試驗	36
3.2.5.抑菌試驗	37
3.2.6.最小抑菌濃度(MIC).....	37
3.2.7.實驗結果	38
第四章、討論與結論	42
參考文獻	44

圖表目錄

表一、篩選出的陰道乳酸菌種菌種及株數	56
表二、酸度	61
表三、抑菌圈大小	67
表四、各種陰道炎分泌物所呈現特徵比較表	72
圖 1-1、乳酸菌抑制致病菌生長過程	73
圖 2-1、女性生殖系統	74
圖 2-2、有機酸之抑菌機制	75
圖 2-3、乳酸菌產生過氧化氫之反應機制	76
圖 2-4、分子結構式	77
圖 3-1、實驗流程	78
圖 3-2、陰道乳酸菌產生生物膜的強度	79
圖 3-3、陰道乳酸菌所產生的 H_2O_2 的能力	80
圖 3-4、陰道乳酸菌產生乳酸的強弱之分	81
圖 3-5、本實驗室篩出的陰道乳酸菌針對 <i>Candida albicans</i> 試驗	82
圖 3-6、本實驗室篩出的陰道乳酸菌針對 <i>Gardnerella vaginal</i> 試驗	83
圖 3-7、本實驗室篩出的陰道乳酸菌針對 <i>Escherichia coli</i> 試驗	84
圖 3-8、MIC (最小抑菌濃度) 試驗	85
圖 3-9、MIC (最小抑菌濃度) 試驗	86
圖 3-10、MIC (最小抑菌濃度) 試驗	87

第一章、緒論

1.1.研究背景

近年來，隨著女性自主意識的提升，其獨立及生活地位逐漸的明朗化，也逐漸邁入有自我的自主權、不須倚靠男性過活的時代。但在外表光鮮亮麗之下可能忽略了內在潛藏的問題，那就是“私密處的問題”。國外研究指出女大學生最常遇到私密處的困擾，也是最想了解的健康問題之一，約有四分之一的女大學生曾有私密處感染病史(Anukam K.C. *et al.*, 2004; Foxman B. *et al.*, 1990)，30 歲以前曾被感染的比率高達 50% (Zielske J.V. *et al.*, 1981)，四分之三的女性有非經常性的念珠菌陰道炎感染(Sobel J.D. *et al.*, 2000)，俗語說「十女九帶」更是透露了大多數的女性都有分泌物過多或氣味不佳等困擾，外加台灣氣候悶熱潮濕，環境條件與生活壓力大，其盛行率可能更為普遍。

為了解決私密處問題，通常會先採取加強清洗、陰道內灌洗、使用衛生棉墊，或是以婦潔液等消毒用品，也就是企圖“徹底清潔”私密部位，以上方法沒改善，就醫是最後也是最不得已的選擇。然而，這些措施反而是導致細菌性陰道炎的高危險因子(Alfonsi G.A. *et al.*, 2004)。不幸的是，目前利用抗生素治療是唯一的選擇，不僅副作用多且復發率高達 50% (Ozkinay E. *et al.*, 2005)。研究發現每 12 個女性中就有 1 人，每年

會發生高達 4 次以上的重覆感染(Hillier S. *et al.*, 1999)。另外根據三軍總醫院的相關研究統計，在泌尿科門診中，平均每 3~4 人，就有一人是罹患泌尿道感染；在美國，每年將有近七百萬人因泌尿道系統感染的問題求診，尤其是女性的求診數目，遠超過男性求診數目達十至十五倍以上；其中以生育年齡層及 65 歲以上女性病患最為常見。

造成陰道發炎感染可分兩種，一種是接觸性皮膚炎，如很多女性為避免分泌物過多而使用護墊，但卻反而容易造成磨擦、悶濕，而引發陰道發炎、發癢症狀；另一種感染途徑，則經由細菌與黴菌傳染，如：念珠菌、大腸桿菌、葡萄球菌與鏈球菌等，所引起的發炎症狀，尤其在經期結束前特別顯著，因血液是細菌、黴菌孳生的溫床，因此在經血後特別易有陰道感染症狀。此外，衣服未乾、潮濕、悶熱或經由性行為、手接觸陰部，將表面皮膚原本存在的葡萄球菌與鏈球菌帶到陰部，都會助長細菌與黴菌孳生。

私密處的悶濕，以及一些生長條件的助長，使念珠菌及葡萄球菌等生長速度過快，讓陰道處的乳酸桿菌來不及抑制。市面上的私密處清潔液，雖然可去除念珠菌等壞菌，但也會除掉抑制壞菌生長的乳酸桿菌等益菌，反而增加感染機率。醫師指出，平常應作息正常、少熬夜，多攝取乳酸桿菌提升免疫力，而增加乳酸桿菌數量就可減少壞菌的數量，也

使得降低陰道炎的發生率，由此可知乳酸桿菌可能與陰道炎的抑制有關。

乳酸菌 (Lactobacilli) 在陰道中的濃度為 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g⁻¹，是健康女性陰道中的優勢共生菌屬(Sobel J.D. *et al.*, 1996)。許多研究證實，女性陰道中的乳酸菌可以抑制多種造成細菌性陰道炎和黴菌性(念珠菌)陰道炎的革蘭氏陽性嗜氧菌、革蘭氏陰性菌(Juarez Tomas M.S. *et al.*, 2003、Skarin A. *et al.*, 1986、Klebanoff S.J *et al.*, 1991、Mastromarino P. *et al.*, 2002)及黴菌，以及引起尿道炎的大腸桿菌之生長，所以失去陰道乳酸菌被認為是造成多種陰道炎和尿道炎的主因(Sobel J.D. *et al.*, 2000)，局部減少或缺乏乳酸菌會增加 2 至 4 倍的陰道炎發生率(Hawes S.E. *et al.*, 1996)，也是反覆性泌尿道感染(Gupta K. *et al.*, 1998)、愛滋病毒感染(Martin H.L. *et al.*, 1999)及陰道癌(Tomas M.S. *et al.*, 2003)的高危險因子。

陰道中的乳酸菌限制致病菌的生長主因有二，第一個原因是彼此相互競爭吸附空間；乳酸菌減少致病菌寄生在陰道上皮細胞的機會，因而使致病菌無法大量繁殖(Boris S. *et al.*, 2000)。第二個原因是乳酸菌可以分泌許多抑菌物質，包括乳酸 (lactic acid)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H₂O₂)、細菌素 (bacteriocins) 等等。細菌素 (bacteriocins) 包括有抗菌蛋

白質與胜肽、reuterin 及雙乙醯等。

(1)乳酸 (lactic acid): 乳酸菌發酵後會產生乳酸、醋酸等有機酸，這些弱酸的蓄積會導致 pH 值下降到微生物無法生長的範圍(Ita P. S. *et al.*, 1991 ;Vandenbergh *et al.*, 1993) (維持在 pH 值 4.5 以下的酸性範圍)(如圖 1-1)。

(2)過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2): 乳酸菌本身缺乏過氧化氫分解酵素，但所含的黃素蛋白氧化(flavoprotein)的氧化酵素，能以氧做為之電子接受體，在氧的存在之下形成過氧化氫(蘇, 1999)，但目前 H_2O_2 的抑菌能力卻還不是很清楚。

(3)細菌素 (Bacteriocins): 乳酸菌可生產具有抗菌性質的蛋白質或胜肽，在這些抗菌的蛋白質或胜肽中，分子量大於 20 kDa 的通常有酵素的活性，抗菌的機制是藉由酵素直接抑制目標菌的細胞膜，這些大分子的蛋白質例如溶菌素(lysin) 及胞壁酶 (muramidase)。而小於 10 kDa 的小分子胜肽，例如細菌素，則是以非酵素形式達到抗菌的作用；即藉由本身的結構特性來破壞目標菌的細胞結構，這些蛋白質和胜肽的結構與種類繁多，主要的作用機轉可能來自抑制其它細菌的細胞壁生合成，或是抑制 DNA、RNA，使細菌沒有足夠的能量執行生合成步驟而無法生存(Abee T.*et al.*, 1995、Jack R.*et al.*, 1995、Parente E.*et al.*, 1999、Simon

L.*et al.*, 2002、Tagg J.R.*et al.*, 1976)。

1.2.研究動機與目的

乳酸菌藉由維持酸性環境、分泌抗菌物質來抑制其它菌種生長或粘附在上皮組織中而且被認為是控制陰道生態系統得主要因素也是陰道中的優勢共生菌種。美國婦產科期刊指出乳酸菌更可以降低陰道炎復發的機率(Miller L.E., *et al.*, 2010)，也更確定研究陰道與共生乳酸菌的防禦機制的動機。

本篇論文之主要實驗目的就是探討利用乳酸菌所產的乳酸、H₂O₂、細菌素以及生物膜來對抗陰道病原菌的能力分析。主要對抗的致病菌種有細菌性陰道炎的 *Gardnerella vaginalis* (陰道伽氏菌)、黴菌性陰道炎的 *Candida albicans* (白色念珠菌)、尿道炎炎的 *Escherichia coli* (大腸桿菌)等。

第二章、相關議題探討

為了防止感染傷害，生殖系統演化出一套防禦機制，這套防禦機制包含二部份，一為陰道的菌種生態平衡；另一則為生殖道的免疫反應。一直到近年，人類才開始普遍得知自己的私密部位具有相當多種類與數量的微生物，其中有些細菌是維繫生殖系統健康的重要防線(Ocaña V.S. *et al.*, 1999)。

生殖系統裡與人類陰道共生的微生物種類超過 50 種以上，乳酸菌 (*Lactobacilli*) 是健康女性陰道中的優勢菌種(Sobel J.D. *et al.*, 1996)。因此維持乳酸菌的菌種生存以及菌相的平衡，對預防各種陰道炎的感染具有重要的關聯性。而須維持乳酸菌的菌種生存，主因有乳酸菌可以與致病菌彼此競爭吸附陰道上皮細胞的機會也可分泌乳酸 (lactic acid)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、抑菌素(bacteriocins)、reuterin 等抑菌物質來抑制致病菌的生長。所以乳酸菌成為陰道防禦機制最重要的一環。

2.1.陰道炎與主要致病菌種

女性生殖系統包含最外部的陰戶、陰道、子宮頸、子宮及輸卵管，是一連串與外界相連的通道 (如圖 2-1)，又因緊鄰肛門，相當容易受到外界致病菌的入侵，一旦陰道受到感染，除了造成分泌物多，不良氣味與騷癢等不適症狀外，也常會導致相當多的併發症，包括骨盆腔疾病

(Sweet R.L., 2000)、增加母親與嬰兒死亡率的異常懷孕與分娩

(McGregor J.A.*et al.*, 2000)、及較易感染愛滋病與性病(Sewankambo N. *et al.*, 1997)。

正常陰道流液包含了陰道上皮的漿性滲出液、子宮頸腺體的清澈潤滑黏液、陰道的複層鱗狀上皮脫屑、及其他由子宮、輸卵管等分泌液所形成，會隨著排卵期、經期、更年期等身體荷爾蒙的變化，在分泌量與形態有所改變。正常陰道分泌物呈現無臭、白色稀薄粘稠物、pH 值小於 4.5。而此分泌物，正常分泌量僅夠防止陰道乾燥，而不致於沾濕內褲。但若經過空氣氧化，會轉變成黃色或棕色。

陰道炎的診斷是由陰道分泌物（俗稱白帶）的分泌量是否增加、分泌物呈現的型態、顏色、氣味，以及是否伴隨其他症狀來判定。陰道分泌物只是女性陰道炎的症狀之一，除了陰道分泌物，其他症狀包括會陰部搔癢、刺痛、性交疼痛、下腹痛、陰道流血及惡臭等。一般泌尿道感染，多半是細菌（特別是大腸桿菌）由尿道口逆行至尿道及膀胱，並在細胞壁上沾附、增生，造成發炎的反應。(表四、各種陰道炎分泌物所呈現特徵比較表) (Sobel J.D., 1997)

2.1.1.陰道炎之種類

1. 黴菌性(念珠菌)陰道炎

陰道會有乳酪狀排出物，小便有灼熱感，行房時常有疼痛的感覺。據 2002 年美國疾管局估計，年輕女性中，有 75% 曾有黴菌感染的經驗，其中 40~45 % 的女性超過兩次，5% 的人會一再發作(Sobel J.D. *et al.*, 2000)，難以根治。其實，黴菌常在健康的女性陰道中出現(Drutz, D.J., 1992)，但是為什麼有人沒事，有的人會有症狀呢？目前還沒有找到確切的原因，性交太頻繁，或是黴菌潛藏在直腸肛門的說法都未獲得證實，有些狀況也可能增加黴菌感染的機會，例如懷孕、控制不佳的糖尿病患、正在服用廣效性抗生素、細胞毒性藥物、或含高濃度雌激素避孕藥的人，以及免疫力低下的人，還有肥胖、甲狀腺或甲狀旁腺、腎上腺功能減退，或機體內環境發生改變時都容易感染念珠菌陰道炎。念珠菌陰道炎主要菌種為 *Candida albicans*，典型症狀為極度搔癢、陰道分泌物增加，分泌物呈現白色厚厚一層附著於陰道黏膜，像起司 (cottage cheese) 一般。症狀包括陰道壁紅腫、會陰灼熱、性交或排尿疼痛等，約占 20-25%。約有 2/3 婦女為無症狀的帶菌者。從陰道粘膜分離的念珠菌有 85%~90% 的為白念珠菌(Ferrer J., 2000.)。白念珠菌是致病性最強的念珠菌。它在婦女外陰和陰道感染率僅次於細菌，而位居第 2 位(Fabio P. *et al.*,

2000)。

2. 細菌性陰道炎

細菌性陰道炎 (bacterial vaginosis, BV) 是最常見陰道炎，是由於細菌菌落附著在陰道上皮細胞所造成。主要致病菌是 *Gardnerella vaginalis*，正常的陰道呈現酸性 ($\text{pH} < 4.5$)，主要菌種為陰道乳酸菌 *lactobacilli*，乳酸菌會分泌乳酸來維持陰道酸性的環境，達到抑制細菌附著的功能。但在細菌性陰道炎病人的陰道中發現原本的乳酸菌種大量減少，而厭氧性細菌 (例如 *Prevotella* sp. and *Mobiluncus* sp.、*Gardnerella vaginalis*、*Mycoplasma hominis*) 大量增生 (Eschenbach D.A. *et al.*, 1989)。在懷孕期間感染細菌性陰道炎容易引發羊膜破裂，造成早產 (preterm birth) (Sobel, J. D., 2000)、流產 (preterm labor) 及產後子宮內膜炎 (postpartum endometritis) (Nelson D.B. *et al.*, 2009)。所以感染 BV 的懷孕婦女必須接受治療，一方面緩解疾病的症狀，一方面還能降低因細菌感染可能引起的併發症及降低其他感染的發生。症狀：病患主要是陰道分泌物有惡臭、類似魚腥味、顏色則呈現白到灰色，可以見到陰道壁上黏著一些分泌物，比例約占 40-50% (Sobel J.D., 1997)。

3. 滴蟲陰道炎

由陰道滴蟲 *Trichomonas vaginalis* 寄生造成，屬於性病 (sexually

transmitted disease, STD) 的一種，一般經由性交傳染。症狀：感染滴蟲陰道炎會造成陰道分泌物增加、伴有搔癢及灼熱感，陰道周圍紅腫會有刺激甚至性交疼痛，陰道分泌物呈現灰綠色、泡沫狀且有惡臭，懷孕婦女感染滴蟲陰道炎，可能造成早期破水、早產及新生兒體重過輕的後遺症，約占 15-20% (Sobel J.D., 1997 、Cotch M. F. *et al.*, 1997))。

4. 尿道感染

*E. coli*及*S. saprophyticus*是泌尿系統感染的主因，大多因為憋尿而造成的尿道感染症，而患者又以年輕女性居多(Holmes K. K. *et al.*, 1999)，女性的泌尿道感染 (Urinary tract infections, UTIs) 通常是細菌經由尿道開口往上而進入膀胱造成感染，而且由於男女性構造上的差異，女性特別容易經由性交而將病菌經由陰道帶入尿道引發感染症。雖然大多數患有復發性UTIs的女性其泌尿道並無異常現象，但有些患者一再發作的原因卻是由於尿道上皮細胞具有較多的*E. coli*及*S. saprophyticus*受體(Holmes K. K. *et al.*, 1999)。患者受感染常出現頻尿、尿急、排尿困難、排尿疼痛或是偶有背部、脅腹疼痛等症狀，嚴重的有血尿、膿尿等症狀。為何女性較易引起感染？女性由於生理結構的關係也就是尿道較短，所以遠較男性容易引起感染，大約有25%的女性(Holmes K. K. *et al.*, 1999)，至少在一生當中會患膀胱炎一次，不少人重複多次感染。典型的泌尿道感染，

通常是由於憋尿、缺乏補充水分或性行為所引起。而懷孕的婦女由於生理期構造的變化，子宮變大後會壓迫到輸尿管，尿液容易滯留，造成細菌滋生的機會，此外，懷孕期間荷爾蒙的變化也會使得泌尿系統變得比較脆弱而容易引起感染。女性在停經之後，由於女性荷爾蒙分泌減少，局部的抵抗力減退，使泌尿道及陰道黏膜乾澀、脆弱、細菌較容易生長，並且也會使陰道及泌尿道感染的機率增加。

2.1.2.陰道炎主要致病菌種

1. 大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)

人和動物腸道中最主要和數量最多的一種細菌，主要寄生於大腸內。是一種兩端鈍圓、能運動、無芽孢的革蘭氏陰性短桿菌。除某些菌型能引起腹瀉外，一般不致病，能合成維生素 B 和 K (Bentley R. *et al.*, 1982)，對人體有益。大腸菌群被定義為所有好氧或兼性好氧。在水淨化和污水處理領域，因大腸桿菌在糞便中數量極多，故常用為檢查水源是否被糞便污染的標誌，其測量標準為大腸菌群指數。當細菌離開腸道進入泌尿道可以導致感染，由於性交會導致細菌進入膀胱，有時被稱作「蜜月膀胱炎」。尿路感染儘管對女性更為普遍，但兩性都可能發生。老年中發病男女比例大體相同。因為細菌總是通過尿道進入泌尿系統，廁所的不衛生會升高感染機率，

但其它因素也很重要（如女性懷孕，男性前列腺肥大），還有一些原因不明。

2. 陰道伽氏桿菌(*Gardnerella vaginalis*)

型態為桿狀或球桿狀，大小約半徑 0.5 μ m 長度 1.5~2.5 μ m；不產生纖維狀組織、莢膜及內孢子；細胞壁含丙胺酸、氨基乙酸、組胺酸、賴胺酸、甲硫胺酸、比克胺酸、絲胺酸、色胺酸；為厭氧菌，生長在人類生殖及泌尿系統，分布於全球，pH6.0~6.5 為最佳生長狀態；最佳適合溫度攝氏 35~37 度，症狀會使陰道分泌物呈稀薄狀、顏色為灰色到白色、有強烈的魚腥味，有時會有肚子痛的症狀。陰道伽氏桿菌為 20~40% 健康婦女陰道中之正常菌群，而在細菌性陰道炎或稱非專一性陰道炎之婦女，此菌與各種絕對厭氧菌（包括 *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* 及 *Peptostreptococcus* spp.）之數目會顯著增加，正常菌群的乳酸菌會減少，然而此菌之致病性角色仍不十分清楚。此菌可引起產後(postpartum)敗血症、子宮內膜炎(endometritis)及陰道膿瘍(abscess) (Imlay J.A. ,2002)。

3. 白色念珠菌(*Candida albicans*)

念珠菌是一種黴菌，屬酵母菌目(Saccharomycetales)，主要以單細胞(unicellular)、酵母菌(yeast; blastospore)型式存在的革蘭氏陽性黴菌，

大小為 4~6 mm，以發芽(budding)方式生殖。還有具酵母型或假菌絲型雙相，是一種雙相型酵母菌，常表現為酵母細胞型，酵母型為圓形或橢圓形，可產生芽生分生孢子。念珠菌是人體常駐菌之一，在正常人體的皮膚和咽喉、口腔、陰道、外陰的粘膜上，均可分離出念珠菌，亦可見於其他臟器中。念珠菌它在人體內不發生症狀時，侵犯組織出現症狀時，則常表現為菌絲型。症狀為分泌物量多，典型的白帶是灰白色，乾黏似乾酪的斑片，黏著在陰道壁上。酵母菌感染大部分是白色念珠菌所引起，一般婦女 4~6%(Anukam K.C. *et al.*, 2004、Foxman B. *et al.*, 1990)，懷孕婦女 15~20%(Sobel, J. D. ,2000)會發生感染。症狀主要為外陰及陰道嚴重搔癢、引起外陰疼痛，外陰有紅斑發疹，也會有水腫或裂紋。引起酵母菌感染的因素很多。懷孕時除了增加陰道內肝糖含量外，並抑制細胞性免疫，都會助長黴菌生長。另外，血糖高也有助黴菌生長。使用抗生素抑制細菌，也會使黴菌反而過度生長(Drutz, D.J. , 1992)。

4. 陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)

有五支鞭毛、可動的原生蟲。Microaerophilic、梨狀、7~10 mm，可吞噬細菌、紅血球，可利用各種 carbohydrate (碳水化合物)，以二分法分裂(binary fission)，以細胞內特殊的小器官 hydrogenosomes

產生能源(World Health Organization. , 1995)。症狀分泌物會呈現膿性泡沫狀白帶，顏色偏黃綠色，同時味道難聞。陰道滴蟲多經性交傳染，偶爾會因浴巾、沖洗管嘴感染。白帶患者中十分之一為這種「白帶蟲」引起，一半淋病患者也會合併此病。感染的婦女只有一半出現症狀，主訴為大量惡臭白帶，小便困難，外陰搔癢，且陰道有充脹感，月經期或剛過後才出現症狀，懷孕時呈急性化。部份感染呈慢性帶菌而無症狀(Cameron D. W. *et al.*, 1990 、Cotch M. F. *et al.*, 1997)。

2.2.乳酸菌

1. 「乳酸菌」是指能夠代謝糖類、產生 50% 以上乳酸之細菌，具有這些功能的細菌包括了：乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、鏈球菌 (*Streptococcus*)、明串球菌 (*Leuconostoc*) 等。但乳酸菌為習慣用語，並不是分類學上正式用語。我們經常講的雙歧桿菌或比菲德菌會產生乳酸及醋酸，但乳酸不到 50%，所以嚴格說來不應稱為乳酸菌。但若由保健營養觀點而言，雙歧桿菌同樣具有安全、健康等乳酸菌所標榜之形象，將之納入乳酸菌家族亦是理所當然。人類飲用發酵乳品歷史非常悠久，所以乳酸菌一直被認為是非常安全的菌種 (GRAS, generally regarded as safe)，是最具代表性的腸內有益菌。屬

於球菌型的乳酸菌屬包括鏈球菌 (*Streptococcus*)、乳酸鏈球菌 (*Lactococcus*)、小球菌 (*Pediococcus*)、明串球菌 (*Leuconostoc*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)；桿菌包括乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 等菌屬(Klaenhammer T.R., 1988、Salminen S. *et al.*, 1998)。

乳酸菌普遍存在於人類生活環境的四周，長久以來與人類食品息息相關，經常被使用於發酵食品的製造，包括蔬菜、穀類、魚肉類與乳品類等原料的發酵，因此乳酸菌是食品工業上很重要的一群微生物。而其中乳酸發酵乳品即是利用乳酸菌將乳品中的糖類轉變為含乳酸的產品，這些產品如乾酪(cheese)、乳酪、發酵乳、乳酸飲料等，基本上這類產品必須含有一定數量以上的活性乳酸菌，因此食用時可以攝取到豐富的營養和享受其特殊的風味。除了增進食品的營養價值外，乳酸菌對人類的健康上亦有所貢獻，如可以抑制腸道內病原菌的生長及維持腸道菌群平衡、改善乳糖不耐症的代謝障礙和提高乳糖的利用率(Kaur I. P. *et al.*, 2002)，如今已有部分科學家認為乳酸菌含有抗腫瘤與降低膽固醇(Adolfsson O. *et al.*, 2004、Galdeano C.M. *et al.*, 2007)及刺激活化免疫系統等醫療效果。甚至近年來更是發現乳酸菌有改善陰道炎的相關性。

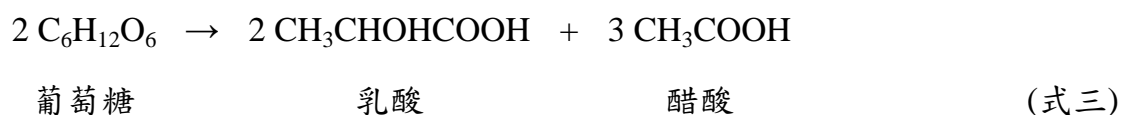
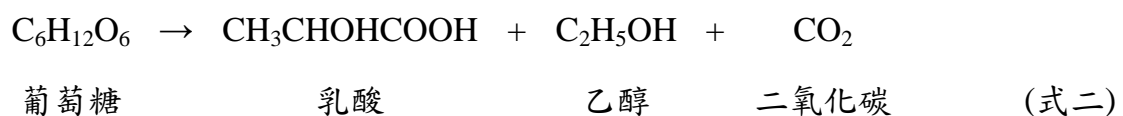
2.2.1. 乳酸菌基本特性

乳酸菌 (Lactic acid bacteria)，廣義而言是指一群可利用碳水化合物進行發酵而產生多量乳酸的細菌之總稱，通常具有下列共同特性：一、為革蘭氏陽性菌，通常無運動性、不產生孢子。二、營養需求十分複雜，須有碳水化合物、氨基酸、維生素、核酸衍生物以及多種生長素等養分才能夠支持其生長。三、通常缺乏過氧化氫酶活性與細胞色素 (cytochrome) (廖，1998)。

乳酸菌在自然界中廣泛地存在，其存在環境通常含有豐富的可溶性碳水化合物、蛋白質分解產物與維生素，且環境中溶氧低(廖，1998)，因此廣泛存在於大自然中的蔬菜、穀類、牛乳或乳製品及肉品等許多發酵產品 (如：發酵肉製品、魚肉香腸、泡菜、發酵豆腐)中被當作發酵種菌使用以及人或動物的腸道或黏膜等環境中都可以很普遍地發現它們的存在。

乳酸菌在發酵過程中會產生乳酸、醋酸、二氧化碳 (CO_2)、過氧化氫 (H_2O_2)、細菌素、洛德因 (reuterin)、及雙乙醯 (diacetyl) 等，均可以抑制一些污染菌或是病原菌的生長(Choi H. J. *et al.*, 2002、Liang H. F. *et al.*, 2003、Messens W. *et al.*, 2002、Sarantinopoulos P. *et al.*, 2002、Tomás M.S. *et al.*, 2002)。乳酸菌代謝糖質而行乳酸發酵，其發酵型式可

大致分為同質乳酸發酵 (homolactic fermentation) 及異質乳酸發酵 (heterolactic fermentation)。前者經醱解作用使碳水化合物分解為丙酮酸後，直接還原成約 90~100% 的乳酸，而後者除了經醱解作用外，亦可經由 phosphoketolase 作用，產生乙醇及二氧化碳等其他化合物。同質發酵反應如(式一)所示，乳酸為其葡萄糖代謝的唯一產物，例如 *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* 等菌屬之。異質乳酸發酵反應如(式二)或(式三)所示，例如 *Lactobacillus brevis* , *Leuconostoc mesenteroids* 等，可代謝葡萄糖生成乳酸、乙醇及二氧化碳。雙歧桿菌則可將 2 莫耳的葡萄糖轉化為 2 莫耳乳酸與 3 莫耳醋酸，反應如(式三)所示。



2.2.2.各乳酸菌屬主要特性簡述

1. 鏈球菌屬 (*Streptococcus*)

屬於 *Lactobacillaceae*，含 19 種菌種，為球狀或卵狀，微好氣性。屬於同質發酵，*S. lactis* 為酸乳及乾酪之主要菌種，但有些於人體可致病(如:人體的上呼吸道疾病)，可存在於腸道、植物與乳品中。多為中溫性、有些可於低溫下生長。本屬中在優酪乳扮演重要角色的是 *Str. thermophilus*，也是本屬中唯一可用在食品中的菌種。此屬尚包括了病原菌，如 *Str. agalactiae*、*Str. pneumoniae*、及 *Str. pyogenes* Mathot (A.G. *et al.*, 2003、Stiles M.E. *et al.*, 1997)，其他的菌種包括 *Str. Macedonicus* (Georgalaki M.D. *et al.*, 2002)及 *Str. bovis* (Lee S.S. *et al.*, 2002)等；此外，*Str. sanguis* 與 *Str. mutans* 則是牙斑上造成蛀牙的細菌(Kawashima M. *et al.*, 2003)。

2. 乳酸鏈球菌屬(*Lactococcus*)

型態多呈卵型或球型，以單一、成對或鏈狀出現，因鏈狀常延伸很長，故有時會誤判為 *lactobacilli*。可進行同質發酵，最適生長溫度為 30℃，可生長於 10℃ 至 45℃ 的溫度中，在含鹽量 6.5% 以上或 pH 值為 9.6 的培養液中無法生長(Mundt J.O., 1986)。可分為兩菌種即 *Lac. lactis* 和 *Lac. raffinolactis*。*Lac. lactis* 又可細分為兩個亞種即 *Lac. lactis* subsp.

cremoris 和 *Lac. lactis* subsp. *lactis*，前者於 40°C 及 pH 為 9.2 時不能生長，且無法利用 arginine 產生 ammonia (Harrigan W.F. *et al.*, 1976)，後者中的一些菌株可產生廣效性細菌素 nisin 及 lacticins 等 (Barakat R.K. *et al.*, 2000、Delves-Broughton J., 1990、O'Sullivan L. *et al.*, 2002、Scannell A.G. *et al.*, 2001、Schleifer K.H. *et al.*, 1987)。*Lac. lactis* 為乳製品工業製造上重要的菌醃，本屬菌種一般可以發揮良好的發酵產酸及風味成分，如雙乙醃等 (Klaenhammer T. *et al.*, 2002、Sørensen K.I. *et al.*, 2000、Stiles M.E. *et al.*, 1997)。

3. 小球菌屬 (*Pediococcus*)

為乳酸四連球菌，細胞具有特殊的型態，會形成四球狀並從兩個平面分裂，屬於同質發酵型之乳酸菌屬 (Nettles C.G. *et al.*, 1993)。此菌屬包含 9 種菌種，其中 *Ped. pentosaceus* 又可分為亞種 *Ped. pentosaceus* subsp. *intermedius*。此菌株所產生之細菌素 pediocin 可有效抑制其他雜菌之生長。廣泛作為發酵蔬菜、乳酪、肉製品或香腸產品之發酵種菌，進而延長製品之保存期限 (Spelaung S.R. *et al.*, 1989、Motlagh A.M. *et al.*, 1992、殷, 1996)。本屬也會造成啤酒的腐敗；例如 *Ped. claussenii* sp. nov. 是造成啤酒腐壞的媒介，*Ped. damnosus* 會使啤酒產生苦味，而 *Ped. cerevisiae* 會在啤酒中產生黏膜 (Dobson C.M. *et al.*, 2002)，這些都是造

成啤酒在發酵中產生臭味的主要菌種。

4. 明串球菌屬(*Leuconostoc*)

為鏈球菌科中之一菌屬，型態為球菌，菌體為成對或鏈狀，營養要求較其他乳酸菌更為嚴苛。屬於異質發酵之乳酸菌屬(Garvie E.I., 1986)。最適生長溫度為 20~30°C。此菌屬包含 6 種菌種。*Leuconostoc* 外形會隨著培養基之不同而可能呈現球狀或短桿形，此外觀差異在電子顯微鏡下方可觀察到。其在蔬菜中的乳酸菌中是佔優勢的菌種，為天然存在，因此在酸泡菜中為重要之菌株(Fremaux C. *et al.*, 1995、Klaenhammer T. *et al.*, 2002、Stiles M.E. *et al.*, 1997)。其中的 *Leu.mesenteroides*、*Leu.paramesenteroides*、*Leu. lactis*、及 *Leu. dextranicum* 常出現在秣草中，而在阿根廷西北方所生產的牛乳及乳酪中，可分離到本屬菌種(Ennahar S. *et al.*, 2003、Medina R. *et al.*, 2001)。本屬的 *Leu. carnosum* 可以在真空包裝的肉製品中做為保護用菌種，而從韓國泡菜中所離的菌種命名為 *Leu. kimchii* sp. nov.(Budde B.B. *et al.*, 2003、Kim J. *et al.*, 2000b、Osmanağaoğlu Ö., 2003)。

5. 乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)

為屬於 Lactobacillaceae，含 15 種菌種，因菌種不同可為同質發酵性或異質發酵性。依生理代謝時 fructose-1,6-diphosphate 及

phosphoketolase 的存在與否而分為三個分群，其中 group I、group II 及少數的 group III 可用在發酵食品中，大部分的 group III 屬於和食品具有相關性的食品腐敗菌(Annuk H. *et al.*, 2003、Jay J.M., 2000、Stiles M.E. *et al.*,1997)。三個分群如下：。

(1) group I：絕對同型發酵 (obligately homofermentative) 乳酸菌；

例如 *Lb. bulgaricus*、*Lb. acidophilus*、及 *Lb. delbrueckii* 等，屬於不發酵戊糖 (pentoses) 的乳酸菌種(Harp E. *et al.*, 2003、Tharmaraj N. *et al.*, 2003、Ulrich R.L. *et al.*, 2001)。

(2) group II：兼性異型發酵 (facultative heterofermentative)，乳酸菌；

例如 *Lb. plantarum*、*Lb. casei*、在30°C時，可產生1.5%的乳酸 (Jay J. M., 2000)，此外屬於group II的還有 *Lb. coryniformis*、*Lb. curvatus*、及 *Lb. farciminis* 等(Tichaczek P. S. *et al.*, 1993、Van Reenen C. A. *et al.*, 1998、Vigolo G. *et al.*, 1996)，其中 *Lb. plantarum* 為發酵肉品、牧草、及蔬菜製品中的重要菌種 (Leal-Sánchez M.V. *et al.*, 2002、Maldonado A. *et al.*, 2002)。

(3) group III：絕對異型發酵 (obligately heterofermentative) 乳酸菌；

例如 *Lb. brevis*、*Lb. buchneri*、*Lb. bifermentans*、*Lb. fermentum*、*Lb. cellobiosus*、及 *Lb. viridescens* 等(Jay J.M., 2000、Stiles M.E. *et*

al.,1997)。本屬菌種為長桿菌，顯微鏡下常見呈長鏈狀。多數是微好氣或厭氣菌生長溫度範圍在2~53℃，最適生長溫度為25~35℃，通常存在於水中。廣存植物體及乳製品中，也常在醃燻及加工肉製品中發現。有些可用為發酵乳之製造，如酸乳及保加利亞乳，有些則用為乾酪之製造。

6. 雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*)

此菌屬至少含有 25 種菌，先後被命名為 *Bacillus bifidus*、*Lactobacillus bifidus* 及 *Bifidobacterium bidifum*。目前分類上屬於放射菌科 (*Actinomyceetaceae*) 中的雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*)。本屬為絕對厭氧菌，型態和其他的乳酸菌不同。型態通常呈現 Y 字型，尾端為棍棒狀，為人體腸胃道中正常的菌叢。本屬在分類上多有爭議的原因之一乃是因其乳酸的產量較醋酸少，二者的產量比為 2:3；但因其為人體腸胃道中的正常菌群，除產生乳酸之外，多數特性與乳酸菌相似，故一般仍將其歸類在乳酸菌中 (Tharmaraj N. *et al.*, 2003)。此菌可用於牛乳、優酪乳及其他食品之發酵，有些則被認為可促進人體健康。

7. 腸球菌屬 (*Enterococcus*)

此屬呈鏈狀之球菌，常存於人體之腸道中，故為污染指標菌之一。除 *Ent. cecorum* 外，其餘本屬的菌種均可在 10℃ 以下生長，而有些 *Ent.*

faecalis 及 *Ent. faecium* 甚至可以在 0~6°C 之間生長，此屬與其他兼性厭氧球菌不同之處在於其有至少 14 個菌種均可於 6.5% (w/v) 的 NaCl 及 pH 9.6 的環境下生長 (Park S.H. *et al.*, 2003a)。除了 *Ent. faecalis* 之外，主要的菌種還包括了 *Ent. faecium* 及 *Ent. durans*。*Ent. faecium* 為健康豬隻小腸、盲腸及直腸中的正常菌叢，也可以從陰道中分離到此菌，在糞便肥料的儲槽中也能存在。所有的菌種均可分解 fesculin (Al Jassim R. A., 2003、Cotta M.A *et al.*, 2003、Jay J. M., 2000)。

2.2.3. 乳酸菌在人體的生理活性

1. 改善乳糖不耐症

當人體缺乏乳糖水解酵素 (lactase) 的時候，會因為無法代謝乳糖故在飲用牛乳後會有腹瀉的現象產生。乳酸菌擁有 lactose 分解酵素 (lactase)，能將乳糖代謝成乳酸使小腸消化吸收，使 β -galactosidase 缺乏症的患者或因腸胃炎等腸疾導致的 lactase 活性不足者可以減緩許多不適。同時乳蛋白在腸道中引起的過敏反應也會因為乳酸菌的蛋白水解酵素而降解而減緩 (Mustapha A. *et al.*, 1997)。

2. 降低膽固醇吸收

乳酸菌影響膽固醇的吸收機制並未清楚，推測是發酵乳當中的成分 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid (HMG) 會抑制膽固醇合成中決定合成

速率之酵素HMG CoA reductase 之作用，使血清中之膽固醇降低(廖，1998)。更有學者發現在體外試驗時，培養於含0.1%~0.5% 膽鹽培養基中的*B. breve*，在越高膽鹽濃度的培養基中，菌株降低膽固醇的能力亦越強。因此證明，在乳酸菌可以耐受的膽鹽濃度範圍內，乳酸菌降低膽固醇的能力和環境中膽鹽的量成正相關，當培養基中膽鹽的含量增加，乳酸菌降低膽固醇的能力也就越強。

3. 抑制腸道病菌生長

除幫助消化外，乳酸菌利用本身的代謝物達到抑制其他病菌的生長。乳酸菌本身即帶有抑菌力(Hernandez D. *et al.*, 2005)或是代謝醣類產生的乳酸具有抑制病原菌的功效(Rossland E. *et al.*, 2005)，它能導致細胞質酸化促使病菌細胞死亡。乳酸菌亦會分泌具有抑菌功能的蛋白質例如 bacteriocin、bavaricin A、enterococcin A 等(Ocana V.S. *et al.*, 2004、Pantev A. *et al.*, 2003)。另外有部分 *Lactobacillus* 可分泌生物界面活性劑(biosurfactants)，去競爭營養源與上皮細胞吸附性(Ouwehand A.C. *et al.*, 2000)而抑制病原菌之吸附及防止泌尿道病原菌作用(Velraeds M.C. *et al.*, 1996)。

4. 調節免疫力

已有臨床實驗證明，服用乳酸菌之後能促進血漿以及腸黏膜免疫系

統產生抗體，同時乳酸菌細胞壁含有某些成分如脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 與 peptidoglycan 可刺激活化巨噬細胞 (phagocyte) 及淋巴細胞(lymphocyte) 再經細胞訊號傳遞，促使細胞產生細胞激素 (cytokines) 和提升 IgA 濃度並促使 INF- γ 或 TNF- α 被分泌，使得腫瘤細胞被抑制(廖，1998)。

5. 減緩高血壓症狀

研究指出飲用乳酸菌醱酵可以適度控制慢性高血壓患者血壓情形 (Seppo L. *et al.*, 2003)。並指出可以從醱酵物當中分離出 VPP 與 LPP 兩種小分子胜肽鏈 (tripeptide) 會抑制血管收縮素轉化酵素(angiotensin converting enzyme, ACE)，進而達到降低血壓的功效(Vercruysse L. *et al.*,2005)。

6. 解決女性私密處困擾

陰道上皮細胞富含肝糖，可由乳酸桿菌代謝成乳酸使陰道維持酸性環境，抑制致病菌的生長，因此正常陰道存在著多種菌落，隨著月經週期彼此維持著微妙的動態平衡，其中可以產生 H₂O₂(過氧化氫)的乳酸桿菌是最主要的菌落，H₂O₂ 可以抑制厭氧菌和其它致病菌生長。細菌性陰道炎的病人其乳酸桿菌數量減少，甚至這些乳酸桿菌不製造 H₂O₂，於是陰道內菌落失去平衡，*Gardnerella vaginalis* 與厭氧菌的數量可增加至

正常量的 10~1000 倍(Eschenbach D.A. *et al.*, 1989)，厭氧菌代謝產生大量 amines(胺)，不但產生魚腥味更使陰道 pH 值上升，陰道上皮細胞脫落，形成分泌物，惡性循環結果，pH 上升(5.0~6.0)，乳酸桿菌變少，*Gardnerella vaginalis* 變多，厭氧菌形成。因此，細菌性陰道炎是由陰道內正常存在的菌落產生不平衡所導致(Nelson D.B. *et al.*, 2009)。

2.2.4. 乳酸菌抑菌機制

細菌間的競爭作用為空間及養分的不足，當面臨惡劣環境時，為了提高自己活存的競爭力，而發展出一套特殊的適應模式，就是分泌出對特定對象具有抑菌活性之物質例如酸、過氧化氫、二氧化碳、抗菌蛋白質與胜肽、reuterin 及雙乙醯等，停止對方的生長，進而提高自己的勢力。

乳酸菌抑菌主要分為物理性及化學性兩方面

1. 物理性抑菌方面

(1) 競爭所需的營養成分：

有益微生物與病原菌共同競爭營養成分，碳、氮源或礦物質，使病原菌無法獲得養分進行增值。

(2) 競爭附著位置：

微生物對腸道須具吸附能力，才可避免因蠕動而被排出體外。

可與其他病原菌競爭腸道結合位置，進而將之排除。

(3) 聚集 (accumulation) 作用：

有益微生物對病原菌產生凝聚，防止病原菌與腸道細胞結合，使病原菌排出體外。

2. 化學性抑菌方面

(1) 有機酸的產生與pH 值的降低：

乳酸菌發酵後會產生乳酸、醋酸等有機酸，這些弱酸的蓄積會導致pH 值下降到微生物無法生長的範圍(Ita P.S. *et al.*, 1991、Vandenbergh P.A. *et al.*, 1993)，但 pH 值下降並不是抑制細菌生長的主因，另外可以抑制微生物生長的原因可能是由乳酸菌所產生的酸未完全解離。以乳酸(lactic acid) 而言，在 pH 值 5.0 時，其 pKa 值為 3.86。這些只有部份解離的酸，多在細菌的細胞外以不帶電荷的分子型式存在，由於不帶電荷，分子較小，故有機會透過細胞膜進入細胞中。這些未解離的酸進入細胞內後進行解離反應並且酸化細胞內部，阻礙胺基酸代謝、DNA 合成、能量代謝以及引起細胞膜滲透率的改變，來達到抗菌的效果，(Ita P.S. *et al.*,1991、Jay J.M., 2000)，有機酸未解離部分濃度越高，抑制微生物的生長效果也越顯著，而未解離部分的形成量多寡則依pH值而定(Ercolani G.L., 1976)(如圖2-2)。

(2) 過氧化氫(H_2O_2)的累積：

乳酸菌在有氧環境下透過本身的黃素蛋白氧化酶(flavoprotein oxidase)或 NADH 氧化酶(NADH oxidase)作用，會將氧分子轉變為過氧化氫(如圖 2-3)，但因乳酸菌本身缺乏過氧化氫分解酵素，使得乳酸菌本身對過氧化氫具有耐性，於是過氧化氫會蓄積於環境。過氧化氫具有強烈的氧化性，可破壞細胞蛋白質的基本結構，因而能對其他細菌產生抑制作用(陳，1991)。例如 *L. lactis* 最低抑制濃度為 125mg/mL，*S. aureus* 僅為 5mg/mL，因此可以有效防止雜菌的生長 (Daeschel M.A., 1989)。

另外可刺激牛乳中的天然的抗菌系統—乳過氧化酶系統(lactoperoxidase system, LPS) 的反應。乳過氧化酶系統係由乳過氧化酵素 (lactoperoxidase, LP)、過氧化氫以及及硫氰酸鹽 (thiocyanate, SCN^-) 三者所組成。當三者以適當濃度同時存在時，即會產生次硫氰酸鹽(hypothiocyanite； $OSCN^-$)，次硫氰酸鹽的產生可以抑制或殺死細菌(Annuk H. *et al.*, 2003)。此外，以高壓處理合併乳過氧化酶系統使用時，可以增加抗菌的效能(Garcia-Graells C. *et al.*, 2003)。乳酸菌產生過氧化氫的含量視菌種以及食品中氧的含量而定，會產生較多的過氧化氫的乳酸菌種為同型發酵的 *lactobacilli*，所以過氧化氫的抗菌功效可能需視來源食品的種類、過氧化氫產生的量、其他輔助因子或是目標菌不同而定，

在各種不同的條件下所產生的抗菌結果會有差異。

(3) 二氧化碳(CO₂)的作用：

二氧化碳的產生可能是源自乳酸菌本身之代謝活動所致，乳酸菌產生二氧化碳，造成厭氧環境而抑制好氧菌的生長，或是蓄積在一些病原菌或污染菌細胞膜的表層，導致細胞膜上通透性改變，造成細胞代謝阻礙。這些機能性的障礙，會妨礙細胞的正常功能，而造成抑制細菌生長的效果(Riley M.A. *et al.*, 2002)。

(4) 細菌素 (bacteriocin):

乳酸菌所生產的細菌素是由核糖體合成的胞外蛋白質或多肽類(Bennik M.H.J. *et al.*, 1997)。細菌素對血緣相近之微生物具有殺菌的功效。其定義為(Tagg J.R. *et al.* 1976)：

- i. 有生物活性的蛋白質。
- ii. 有抑制細菌增殖的靜菌作用 (bacteriostatic action) 與殺菌作用(bactericidal action)。
- iii. 對細胞具有特定的作用部位。
- iv. 受質體 (plasmid) 所調控。
- v. 只對與自身血緣接近的微生物具有作用。

細菌素的特性為由細菌代謝所產生的具有生物活性之蛋白質或是

多肽類，產生細菌素的基因以及宿主細胞對細菌素的免疫基因大部分都位在質體上(Tagg J.R. *et al.* 1976)。細菌素之生產過程為細菌素相關基因經由轉錄作用 (transcription) 產生 mRNA 片段，再經轉譯作用 (translation) 產生 pre-或 pro-bacteriocin (細菌素前驅物)，然後再將細菌素前驅物移物 (translocation) 到細胞膜上，並將細菌素前驅物的 leader peptide 去除，修飾細菌素前驅物形成雙硫鍵 (此步驟只限於革蘭氏陽性菌)，再經修飾成具有生理活性的細菌素，留在細胞膜上或是分泌到細胞膜外(Abee T. *et al.*, 1995、Jack R.W. *et al.*,1995、Kupke T. *et al.*, 1996)。乳酸菌所產之細菌素包括 acidolin, acidophilin, lactacin, plantacin, nisin 及 bulgarcus 等。依細菌素之生化及基因特性將其分為四類(Klaenhammer T. R., 1993)：

i. lantibiotics：

為小分子胜肽，具熱安定性。由 19~37 個胺基酸組成，結構中常有不常見之胺基酸，抑菌範圍較廣。主要作用於細胞之細胞膜，破壞質子驅動力 (proton motive force)，抑制胺基酸的運輸，例如 *Lactococcus lactis* (nisin)(Hurst A., 1981)。

ii. non-lantibiotic-small heat-stable peptide

具熱安定性，其結構中不含胺基酸。此類細菌素並不多見，抑菌範圍狹窄，只作用於血緣相近之菌種，主要是吸附於作用細

胞膜上，但不用像 nisin 作用時需要特殊受器作為介質。

iii. large heat-labile proteins

分子量大於 30,000 Da，不具熱安定性。例如 caseicin 80

(*Lactobacillus casei* B80)(Rammelsberg M. *et al.*, 1990)。

iv. complex proteins

其分子結構必須含有醣類或脂質才具有抑菌活性。

Lantibiotics 與 small heat-stable nonlantibiotics 這兩類細菌素的單體 (monomers) 吸附於目標細胞表面並嵌入細胞膜後，單體產生聚集並造成細胞膜的孔洞，引起 ATP、胺基酸及金屬離子等胞內物質的流失或生化反應的阻礙，導致細胞死亡(Daeschel M.A., 1989)。以乳酸鏈球菌素而言，它的作用點在於敏感菌株細胞膜上的磷脂質(phospholipid)，並引起胺基酸及陰離子的快速流失，而細胞膜的破裂則是由於該物質使氫硫基 (sulfhydryl group) 失活所致(廖, 1998)。*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 產生的細菌素—dioplococcin，能阻止 DNA 和 RNA 之生合成，並減少蛋白質之合成(Davey G.P., 1981)。

(5) 天然滅菌劑 (Reuterin):

Reuterin 是由人或動物的腸胃道所分離出的乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* 在厭氧的狀態下發酵 glycerol 後所產生的滅菌物質(如圖 2-4)，

reuterin 是一低分子量，具良好熱穩定性之物質，具廣泛的抗菌作用，能抑制革蘭氏陽、陰性菌、酵母菌、黴菌及原蟲等，其抑菌作用機制可能與 RNA 氧化還原酶 (ribonucleotide reductase) 或硫氫基酵素 (sulfhydryl enzyme) 受到 reuterin 之抑制而引起 DNA 合成作用受到阻礙有關(T. L. Talarico *et al.*, 1989)。主要特性為具有高溶解度以及 pH 值為中性等。

(6) 雙乙醯 (diacetyl):

乳酸菌所產生的雙乙醯為食品風味組成的要素之一，是乳製品風味的主要來源，為丙酮酸經乳酸菌分解而得，對於酵母菌及革蘭氏陰性菌具有抑制效果，而且效果隨pH值降低而增加。其抑菌機制可能藉由阻礙革蘭氏陰性菌對精胺酸 (arginine) 的利用(Daeschel M.A., 1989)，除了革蘭氏陰性菌之外，雙乙醯對於酵母菌也會有抗菌的作用(Hoefnagel M.H.N. *et al.*, 2002、Sarantinopoulos P. *et al.*, 2002、Vandenbergh P.A. *et al.*, 1993)。但是雙乙醯具有強烈的揮發性氣味，因而不適用於食物之保存。

第三章、材料與方法

3.1.材料

MRS (Man Rogos Sharpe) : 啟新生技公司所購得

YM (Yeast Extract & Malt Extract) : 啟新生技公司所購得

LB (Luria-Bertain) : 啟新生技公司所購得

Phenol (酚紅) : 啟新生技公司所購得

TMB : 3,3',5,5'-teramethyl benzidine, Sigma 所購得

HRPO (horseradish peroxidase) : 2 U/50 mL, Sigma 所購得

H₂O₂ (過氧化氫) : M = 34.01 g/mol, Sigma 所購得

Sheep (綿羊血) : blood:creative media products 所購得

BHI (Brain Heart Infusion) : Oxoid 所購得

Lactic acid (乳酸) : 85%, 友和貿易公司所購得

Gardnerella vaginalis (陰道伽氏菌): 本實驗室所篩出

Escherichia coli (大腸桿菌): 本實驗室所篩出

Candida albicans (白色念珠菌): 本實驗室所篩出

3.2.實驗方法

實驗流程如圖 3-1 所示，首先先進行篩菌試驗，鑑定菌種後檢測乳酸菌特性的能力分析，如：生物膜強度、產 H_2O_2 的有無及含量多寡和產乳酸之強弱，再檢測陰道乳酸菌與致病菌對 H_2O_2 與乳酸之最小抑菌濃度(MIC)，最後進行抑菌試驗及測量其抑菌圈大小，而得知最佳抑菌菌株及菌種。

3.2.1.篩菌試驗

取待檢測檢體加入 1000 μ l MRS broth，混合均勻，從中取出 750 μ l 加入 250 μ l 50%甘油，保存，剩下的 250 μ l 中，取 100 μ l 準備操作連續稀釋，剩下的 150 μ l 自行保存。

連續稀釋&塗盤

取 9 個 eppendorf 各加入 900 μ l MRS broth，在操作連續稀釋，並混合均勻。取 100 μ l 已經稀釋好的菌液加入 MRS plate 中，並使用過完火已冷卻的塗抹棒均勻塗抹。完成後厭氧培養於 37°C，24~48 小時。

挑菌

依生長情況選擇自己所需要的菌(例如：產酸度、菌相、大小...)，取 1000 μ l MRS broth 到 eppendorf。利用過完火冷卻的 loop 取所需

要的菌至 eppendorf 中。培養於 37°C，24 小時。

次培養(目的為確認所挑的菌落為單一的菌落無污染情況)

從 eppendorf 中取 750 μ l 菌液到另一個乾淨 eppendorf，並離心 12000 rpm，5 min，去掉上清液，加入 750 μ l MRS broth 再加入 250 μ l 50% 甘油，保存。剩下的 250 μ l 菌液，利用過完火冷卻的 loop 四區劃線於 MRS plate。完成後厭氧培養於 37°C，24~48 小時。

確認單一菌落

確認為單一菌落無污染後，將 plate 拍照存檔。取 1000 μ l MRS broth 到 eppendorf。利用過完火冷卻的 loop 將單一菌落取至 eppendorf 中。培養於 37°C，24 小時。次日，從 eppendorf 中取 500 μ l 菌液到另一個乾淨 eppendorf，並離心 12000 rpm，5 min。去掉上清液，加入 750 μ l MRS broth 再加入 250 μ l 50% 甘油，保存。剩下的 500 μ l 菌液準備操作 RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA)確認。

3.2.2.生物膜

活化

取100 μ l 陰道乳酸菌菌液至1000 μ l MRS broth 的 eppendorf 中。培養於37°C，24小時。

生物膜

取活化後之100 μ l 陰道乳酸菌菌液至3 ml MRS broth 的玻璃管中。

培養於37°C，48小時。上清液倒掉，加入1%的酚紅指示劑，旋轉2

分鐘，再將上清液倒掉，室溫烘乾，24小時，即可觀察附著在乳酸

菌生物膜的酚紅指示劑。

3.2.3.酸度

取活化後之100 μ l 陰道乳酸菌菌液至10 ml MRS broth 的玻璃管中。

培養於37°C，48小時。先測其pH 值而後再滴1 N 的 NaOH 使其菌液pH

值達中性。而看其滴入量帶入公式。

酸度公式

$$\frac{x \cdot 0.009}{10ml} \times 100\% , x \text{ 為滴入 } 1N \text{ NaOH 量}$$

3.2.4.產 H₂O₂ 試驗

本實驗利用TMB和酵素 (HRPO)會與乳酸菌所產生的H₂O₂生成藍色反應，以利觀察乳酸菌所產生的H₂O₂的多寡。準備好所需要的培養基，並養好所需要的乳酸菌。次日，四區劃線於製備好的培養基上。厭氧培養於37°C，48小時。看結果前，於操作台內烘乾培養基。觀察培養基變藍色情形。(越藍表示產H₂O₂能力越強)

培養基製備：

MRS 100 ml 加上 TMB 0.025 g 在加上酵素 (HRPO) 1 μ l。

3.2.5. 抑菌試驗

先養好所需要的致病菌和乳酸菌，準備好所需要的培養基

(*Gardnerella vaginalis* : BHI+5% Sheep、*Escherichia coli* : LB、

Candida albicans : YM)。要操作的致病菌利用分光光度計調到 % T_{600}

= 20，每片plate加入100 μ l致病菌，利用過完火的塗抹棒塗抹均勻。利

用1000 μ l大小的Tip尾端挖洞。再填入100 μ l MRS 培養基，等待冷卻。

在所挖的洞分別加入陰道乳酸菌。培養於37°C，24~48小時，觀察結果，

測量抑菌圈直徑。

3.2.6. 最小抑菌濃度(MIC)

先養好所需要的致病菌和乳酸菌，準備好所需要的培養基

(*Gardnerella vaginalis* : BHI+5% Sheep、*Escherichia coli* : LB、

Candida albicans : YM)。要操作的致病菌和乳酸菌利用分光光度計調

到 % T_{600} = 20每片plate加入100 μ l致病菌和乳酸菌，利用過完火的塗抹

棒塗抹均勻。利用1000 μ l大小的Tip尾端挖洞。在所挖的洞分別加入稀

釋後的乳酸和 H_2O_2 。培養於 37°C ，24~48小時，觀察抑菌圈結果，得知最大稀釋倍數，再去換算最小抑菌濃度。

3.2.7.實驗結果

此實驗篩選出9種乳酸菌菌種共有82株菌。*Lactobacillus fermentum* : 6株、*Lactobacillus plantarum* : 28株、*Lactobacillus rhamnosus* : 11株、*Lactobacillus reuteri* : 8株、*Lactobacillus casei* : 14株、*Lactobacillus acidophilus* : 2株、*Lactobacillus gasseri* : 9株、*Lactobacillus vaginalis* : 3株、*Lactobacillus johnsonii* : 1株。

表一為篩選出的陰道乳酸菌種菌種及株數。結果顯示乳酸菌產生乳酸的pH值在3.6~4.55之間(24小時)、3.5~4.5(48小時)，酸度在0.198~0.045%(表二)，各菌種平均酸度：*Lactobacillus fermentum* : 0.114%、*Lactobacillus plantarum* : 0.157%、*Lactobacillus rhamnosus* : 0.146%、*Lactobacillus reuteri* : 0.109%、*Lactobacillus casei* : 0.145%、*Lactobacillus acidophilus* : 0.126%、*Lactobacillus gasseri* : 0.139%、*Lactobacillus vaginalis* : 0.108%、*Lactobacillus johnsonii* : 0.045%。從表得知相同的pH值並不代表有相同的酸度。

圖3-2為利用酚紅指示劑的深淺得知陰道乳酸菌在玻璃管壁所形成的生物膜強弱。如：則最佳的菌株有Luc11、Luc20、Luc38、Luc39、Luc51、Luc54、Luc76、Luc79、Luc81，最弱的有Luc2、Luc7、Luc16、Luc18、Luc49、Luc53、Luc57、Luc59、Luc61、Luc62、Luc63、Luc65、Luc67、Luc68、Luc83、Luc88、Luc90、Luc92、Luc93、Luc97、Luc98、Luc99、Luc102、Luc104、Luc107、Luc108、Luc110、Luc112、Luc113、Luc119、Luc125、Luc127、Luc128。

圖3-3是陰道乳酸菌與TMB的化學反應產生藍色效果可知乳酸菌產生 H_2O_2 的多寡，如：則最佳的菌株有Luc30、Luc36、Luc37、Luc101、Luc117，無產生的有Luc2、Luc33、Luc50、Luc61、Luc63、Luc73、Luc80、Luc83、Luc86、Luc87、Luc88、Luc92、Luc97、Luc98、Luc102、Luc104、Luc112、Luc113、Luc119。圖3-4為陰道乳酸菌在培養基上生成乳酸之強弱，如：則最佳的菌株有Luc11、Luc15、Luc16、Luc17、Luc30、Luc33、Luc36、Luc37、Luc54、Luc63、Luc67、Luc68、Luc82、Luc85、Luc92、Luc93、Luc95、Luc103、Luc109、Luc111、Luc114、Luc123、Luc125、Luc128，不明顯的有Luc49、Luc50、Luc53、Luc57、Luc61、Luc83、Luc88、Luc90、Luc102、Luc113、Luc119。

圖3-7為陰道乳酸菌與*Candida albicans*的抗菌試驗，發現只有Luc71有抗菌的效果，Luc71為*Lactobacillus reuteri* (表三)。

圖3-8為陰道乳酸菌與*Gardnerella vaginalis*的抗菌試驗，發現有抗菌能力的有Luc11、Luc15、Luc16、Luc22、Luc36、Luc38、Luc39、Luc54、Luc59、Luc62、Luc63、Luc65、Luc66、Luc68、Luc69、Luc71、Luc72、Luc73、Luc74、Luc75、Luc77、Luc79、Luc80、Luc82、Luc83、Luc85、Luc93、Luc95、Luc96、Luc98、Luc101、Luc103、Luc104、Luc105、Luc107、Luc109、Luc111、Luc114、Luc115、Luc117、Luc120、Luc123、Luc125、Luc127、Luc128、Luc518(表三)。

圖3-9為陰道乳酸菌與*Escherichia coli*的抗菌試驗，發現有抗菌能力的有Luc15、Luc16、Luc17、Luc20、Luc22、Luc30、Luc33、Luc36、Luc37、Luc38、Luc39、Luc51、Luc54、Luc59、Luc61、Luc62、Luc63、Luc65、Luc67、Luc68、Luc69、Luc70、Luc72、Luc73、Luc74、Luc75、Luc76、Luc79、Luc82、Luc83、Luc85、Luc88、Luc89、Luc90、Luc91、Luc93、Luc95、Luc96、Luc97、Luc98、Luc103、Luc104、Luc105、Luc107、Luc108、Luc109、Luc110、Luc111、Luc114、Luc115、Luc120、Luc122、Luc123、Luc125、Luc127。而Luc74、Luc75、Luc105為*Lactobacillus rhamnosus*，其抑菌能力效果更是明顯(表三)。

圖3-10為H₂O₂和乳酸對 *Candida albicans* 的MIC試驗，H₂O₂對 *Candida albicans* 的最小抑菌濃度為0.116mM，乳酸對 *Candida albicans* 的最小抑菌濃度為85%。

圖3-11為H₂O₂和乳酸對 *Gardnerella vaginalis* 的MIC試驗，H₂O₂對 *Gardnerella vaginalis* 的最小抑菌濃度為0.029mM，乳酸對 *Gardnerella vaginalis* 的最小抑菌濃度為4.25%。

圖3-12為H₂O₂和乳酸對 *Escherichia coli* 的MIC試驗，H₂O₂對 *Escherichia coli* 的最小抑菌濃度為0.0116mM，乳酸對 *Escherichia coli* 的最小抑菌濃度為2.125%。(H₂O₂原液濃度為11.6 mM，乳酸原液濃度為85%)。

最後在所有抗菌試驗中發現 *Lactobacillus reuteri*此菌種針對 *Candida albicans*和*Gardnerella vaginalis* 都有抑制能力效果；
Lactobacillus rhamnosus 對*Escherichia coli*的抑制能力最好。

第四章、討論與結論

乳酸菌為陰道菌蟲中的主要菌種，此研究中偵測生物膜就是試驗乳酸菌吸附在陰道上皮細胞的能力，吸附性愈強則減少致病菌寄生在陰道上皮細胞的機會就愈大，因而使致病菌更無法大量繁殖。乳酸菌發酵後會產生乳酸、醋酸等有機酸，這些弱酸的蓄積會導致 pH 值下降到微生物無法生長的範圍，於是檢測乳酸強度與酸度更是可得知哪種菌種和哪株菌是最可以降低陰道 pH 值的，但相同的 pH 值並不代表有相同的酸度。維持一個健康的陰道，乳酸菌產生 H_2O_2 和細菌素來抑制致病菌的生長是非常重要的功能，但事實上只有一些乳酸菌種能產生足量的 H_2O_2 和不同的乳酸菌種就有不同的細菌素能去抑制陰道厭氧的菌蟲和鏈球菌以及部分的 *Escherichia coli* 和 yeast。根據之前的研究指出生產的 H_2O_2 主要是負責抑制 *Gardnerella vaginalis* 和 *Candida albicans*，文中更指出雖然無法有效的完全抑制但只要低於致病數就等於有抑菌的效果。

在本論文中，我們利用乳酸菌活菌針對各病菌的抑制能力進行實驗，實驗結果發現 Luc71 菌株 (*Lactobacillus reuteri*) 對 *Candida albicans* 和 *Gardnerella vaginalis* 都有抑制的效果；*Lactobacillus rhamnosus* 對 *Escherichia coli* 的抑制能力最好。據之前報告中指出 *Lactobacillus reuteri* 會產生 reuterin 此類抑菌素，文獻中更指出 reuterin 具廣泛的抗菌作用，

能抑制革蘭氏陰性菌、革蘭氏陽性菌、酵母菌、黴菌及原蟲等。於是本實驗也針對 *Lactobacillus reuteri* 進行 reuterin 萃取，再實驗比較對各病菌的抑制能力。實驗結果顯示，萃取出 reuterin 都沒有抑菌的效果，其原因可能是沒有萃取出 reuterin 或是活菌具有多方面的抑制條件而 reuterin 就只有單一條件。因此未來應用乳酸菌於陰道炎的治療，其乳酸菌的抑菌機制是有待更深入之研究。

乳酸菌控制陰道致病菌是扮演著一個重要的角色但也是一個非常複雜的機制，而本實驗的乳酸、 H_2O_2 、reuterin 和生物膜只是其中的一部分，此時就要看抑制的目標致病菌為何，於是可能還有其他的抑菌機制存在，如：如同腸胃道的，乳酸菌可能可以選擇性的抑制上皮細胞分泌的免疫發炎啟動分子以及其餘多種的細菌素。在 2010 年的美國婦產科期刊更證實增加陰道乳酸菌可以降低陰道炎的復發機率。乳酸菌維持陰道正常菌群是非常重要的，所以做為感染的屏障是逐漸被認可的，乳酸菌產生乳酸和 H_2O_2 的作用在維持一個健康的陰道也一直都是有所可稽的。總言之女性生殖系統就是藉由乳酸菌的抑菌功能以及維持菌種平衡，來預防病原體的入侵與生長。本論文的結論為經過種種測試之後，就可挑選出最有抑制效果的陰道乳酸菌。

參考文獻

蘇遠志・1999・應用微生物學，國立編譯館，華香園出版社，台北。

廖啟成・1998・乳酸菌之分類及應用，食品工業，30(2): 1-10。

陳勁初・1991・以乳酸菌保存食品之機制，食品工業23(9)：17-21。

殷儷容・1996・乳酸菌*Pediococcus pentosaceus* L和*Pediococcus pentosaceus* S之特性探討及其對發酵鯖魚香腸中微生物生長之影響，碩士論文，國立台灣海洋大學水產食品科學研究所。

Abee, T., Klaenhammer, T.R., Letellier, L. (1994) Kinetic studies of the action of lacticin , a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl. Environ. Microbiol. 60(3): 1006-1013.

Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995) Bacteriocin: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int. J. Food Microbiol. 28: 169-185.

Adolfsson, O., Meydani S.N., Russell R.M. (2004) Yogurt and gut function. Am J Clin Nutr. 80: 245-256.

Alfonsi, G.A., Shlay, J.C. (2004) What is the best approach for managing recurrent bacterial vaginosis J Fam Pract. 53(8):650-652.

Al Jassim, R.A. (2003) *Lactobacillus ruminis* is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig. Lett. Appl. Microbiol. 37(3): 213-217.

Annuk, H., Shchepetova, J., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., Mikelsaar, M. (2003) Characterization of intestinal lactobacilli as putative

probiotic candidates. J. Appl. Microbiol. 94: 403-412.

Anukam, K.C., Osazuwa, E.O., Reid, G. (2004) Receptivity for probiotic products among premenopausal female students in an African university. Sex Transm Dis .31(8):460-4.

Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J. (2000) Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. Int. J. Food Microbiol. 62(1-2): 83-94.

Bennik, M.H.J., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., (1997) Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2074-2076.

Bentley, R., R. Meganathan, (1982) *Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **46**(3): p.241-280.

Boris, S., Barbes, C. (2000) Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes Infect . 2: 543–546.

Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., Koch, A.G. (2003) *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: Culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. Int. J. Food Microbiol. 83(2): 171-184.

Cameron, D.W., N.S. Padian. (1990) Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases. *AIDS* 4 Suppl .1:S99-103.

Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.B., Lee, J.C., Lee, D.W., Choi, S.W., Park, J.M., Pyun, Y.R. (2002) *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52(2): 507-511.

Cotch, M.F., J.G. Pastorek, R.P. Nugent, S.L. Hillier, R.S. Gibbs, D.H. Martin, D.A. Eschenbach, R. Edelman, J.C. Carey, J.A. Regan, M.A. Krohn, M.A. Klebanoff, A.V. Rao, G.G. Rhoads. (1997) *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm.Dis.*

24:353-360.

Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Zeltwanger, R.L. (2003) Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environ. Microbiol.* 5(9): 737-745.

Daeschel, M.A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 164-167.

Davey, G.P. (1981) Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. *New Zealand J Dairy Sci Technol.* 16:187-190.

Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* p. 100-112.

Dobson, C.M., Deneer, H., Lee, S., Hemmingsen, S., Glaze, S., Ziola, B.(2002) Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(6): 2003-2010.

Drutz, D.J. (1992) Lactobacillus prophylaxis for Candida vaginitis. *Ann. Intern. Med.* 116:419–420.

Ercolani, G.L., (1976) Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Appl Environ Microb.* 31(6): 847-852.

Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L. (1989) Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 27:251-256.

Fabio, P., E.D. Cintio, V. Chiantera, S. Guaschino. (2000) Determinants of different *Candida* species infections of the genital tract in women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 93:141-145.

Ferrer, J. (2000) Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics.* 71: S21-27.

Foxman B, Chi JW. (1990) Health behavior and urinary tract infection in college-aged women. *J Clin Epidemiol.* 43(4):329-37.

Fremaux, C., Hechard, Y., Cenatiempo, Y. (1995) Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. Microbiology.141 (7): 1637-1645.

Galdeano, C.M., LeBlanc, M., Vinderola, G., Bibas, M.E.B., Perdígón, G. (2007) Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Clin Vaccine Immunol. 14: 485–492.

Garcia-Graells, C., Van Opstal, I., Vanmuysen, S.C., Michiels, C.W. (2003) The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. Int. J. Food Microbiol. 81(3): 211-221.

Garvie, E.I. (1986) Genus *Leuconostoc*, In P. H. A..p.1071-1075.

Georgalaki, M.D., Van Der Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L., Tsakalidou, E. (2002) Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198. Appl. Environ. Microbiol. 68(12): 5891-5903.

Gupta, K., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Roberts, P.L., Fennell, C.L., Stamm, W.E. (1998) Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. J Infect Dis.178:446-450.

Harp, E., Gilliland, S.E. (2003) Evaluation of a select strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as a biological control agent for pathogens on fresh-cut vegetables stored at 7 degrees C.J. Food Prot. 66(6): 1013-1018.

Harrigan, W.F., M.E. McCance. (1976) *Streptococcus-Leuconostoc-Pediococcus* group, In Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc., London. p. 270-274.

Hawes, S.E., Hillier, S.L., Benedetti, J., Stevens, C.E., Koutsky, L.A., Wolner-Hanssen, P., Holmes, K.K. (1996) Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. J Infect Dis.174:1058–6.

Hernandez, D., E. Cardell, V. Zarate, (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. J Appl Microbiol. 99: 77-84.

Hillier, S., Holmes, K. (1999) Bacterial vaginosis. In: K. Holmes, P. Sparling, P. Mardh et al (eds). Sexually Transmitted Diseases, 3rd Edition. New York: McGraw-Hill. 563-586.

Hoefnagel, M.H.N., Starrenburg, M.J.C., Martens, D.E., Hugenholtz, M., Swam, I.I.V., Bongers, R., Westerhoff, H.V., Snoep, J.L. (2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: Kinetic modelling, metabolic control and experimental analysis. Microbiology. 148:1003-1013.

Holmes, K.K., P., S.F., Per-Anders, M., Stamm, W.E., Piot, P., Wasserheit, J.N. (1999) Sexually transmitted diseases, 3rd ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.

Hurst, A. (1981) Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123.

Imlay, J.A. (2002) How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. Adv. Microb. Physiol. 46: 111–153.

Ita, P.S., Hutkins, R.W. (1991) Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. J. Food Prot. 54(1): 15-19.

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59(2): 171-200.

Jay, J.M. (2000) Modern Food Microbiol. 6nd Ed. Apac Publishers. Las Vegas, Nevada. p. 269-271.

Juarez Tomas, M.S., Ocana, V.S., Wiese, B., Nader-Macias, M.E. (2003) Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 52: 1117–1124.

Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A. (2002) Probiotics: potential pharmaceutical Applications. Eur. J. Pharm. Sci. 15: 1-9.

Kawashima, M., Hanada, N., Hamada, T., Tagami, J., Senpuku, H. (2003) Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. Oral Microbiol. Immunol. 18(4): 220-225.

Kim, J., Chun, J., Han, H.U. (2000b) *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50(5): 1915-1919.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-86.

Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349.

Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W; Weimer, B., Zagorec, M., Siezen R. (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Van Leeuwenhoek .82(1-4): 29-58.

Klebanoff, S.J., Hillier, S.L., Eschenbach, D.A., Waltersdorff, A.M. (1991) Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating Lactobacilli. J Infect Dis. 164: 94-100.

Kupke, T., Götz, F. (1996) Post-translational modifications of lantibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. 69: 139-150.

Leal-Sánchez, M.V., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernandez, A., Ruiz-Barba, J.L. (2002) Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. Appl. Environ. Microbiol. 68(9): 4465-4471.

Lee, S.S., Hsu, J.T., Mantovani, H.C., Russell, J.B. (2002) The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*. FEMS Microbiol. Lett. 217(1): 51-55.

Liang, H.F., Chen, C.N., Chang, Y., Sung, H. W. (2003) Natural antimicrobial agent (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for sanitization of biological tissues inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng. 84(2): 233-239.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B., Jimenez-Diaz, R. (2002) The

locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lb. plantarum* strains isolated from olive fermentations. Int. J. Food Microbiol. 77(1-2): 117-124.

Martin, H.L. Jr, Richardson, B.A., Nyange, P.M., Lavreys, L., Hillier, S.L., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J.O., Bwayo, J., Kreiss, J. (1999) Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. J Infect Dis. 180:1863-1868.

Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U., Matteuzzi, D. (2002) Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. J Appl Microbiol. 93: 884–893.

Mathot, A.G., Beliard, E., Thuault, D. (2003) *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. J. Dairy. Sci. 86(10): 3068-3074.

McGregor, J.A., French, J.I. (2000) Bacterial vaginosis in pregnancy. Obstet Gynecol Surv. 55:S1–19.

Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S., Oliver, G. (2001) Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. J. Food. Prot. 64(4): 559-563.

Messens, W., De Vuyst, L. (2002) Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs - a review. Int. J. Food Microbiol. 72(1-2): 31-43.

Mital, B.K., Garg, S.K. (1995) Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. Crit. Rev. Microbiol. 21(3): 175-214.

Motlagh, A.M., S. Holla, M.C. Johnson, B. Ray, R.A. Field. (1992) Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. J. Food Prot. 55: 337-343.

Mundt, J.O. (1986) Lactic acid streptococci, *In* P. H. A. p. 1065-1066.

Mustapha, A., Jiang, T., D.A. Savaiano, (1997) Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity lactose transport and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci. 80: 1537-45.

Nelson, D.B., Hanlon, A., Hassan, S., Britto, J., Geifman-Holtzman, O., Haggerty, C., Fredricks, D.N. (2009) Department of Public Health, College of Health Professions, Temple University, USA. J Perinat Med. 37(2):130-4

Nettles, C.G., S.F. Barefoot. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 56: 338-356.

Ocana, V.S., M. Elena Nader-Macias. (2004) Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. Methods Mol Biol. 268, 347-53.

Ocaña, V.S., Bru, E., de Riu Holgado, A.A.P., Nader-Macías, M.E. (1999) Surface characteristics of lactobacilli isolates from human vagina. J Gen Appl Microbiol. 45:203-212.

Osmanağaoğlu, Ö. (2003) Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged sucuk. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 27: 471- 480.

O'Sullivan, L., Morgan, S.M., Ross, R.P., Hill, C. (2002) Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lacticin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. J. Dairy Sci. 85(9): 2130-2140.

Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Tolkko, S., Salminen, S.J. (2000) The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbureckii* subsp. *bulgaricus*. Lett Appl. Microbiol. 30: 10-13.

Ozkinay, E., Terek, M.C., Yayci, M., Kaiser, R., Grob, P., Tuncay, G. (2005)

The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections. BJOG: Int J Obstet Gynaecol. 112: 234–240.

Pantev, A., R. Valcheva, S. Danova, I. Ivanova, I. Minkov, T. Haertle, J.M. Chobert. (2003) Effect of enterococcin A 2000 on biological and synthetic phospholipid membranes. Int J Food Microbiol. 80: 145-52.

Parente, E., Ricciardi A. (1999) Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(5): 628-638.

Park, S.H., Itoh, K., Fujisawa, T. (2003a) Identification and characteristics of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. J. Appl. Microbiol. 95(2): 294-300.

Rammelsberg, M., Radler, F. (1990) Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bacteriol. 69: 177-184.

Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002) Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. Biochimie. 84: 357-364.

Rosslund, E., T. Langsrud, P.E. Granum, T. Sorhaug. (2005) Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. Int J Food Microbiol. 98: 193-200.

Salminen, S., Wright, A.V., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Willem, M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. Mattila-Sandholm. (1998) Demonstration of safety of probiotics. Int J Food Microbiol. 44: 93–106.

Sanders, M.E. (1993). Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. J. Dairy. Sci. 76(7): 1819-1828.

Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulo, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2002) Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. Int. J. Food Microbiol. 72(1-2): 125-136.

- Scannell, A.G., Schwarz, G., Hill, C., Ross, R.P., Arendt, E.K. (2001) Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. *Int. J. Food Microbiol.* 64(1-2): 151-159.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., R. Korpela. (2003) A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.* 77: 326-30.
- Sewankambo, N., Gray, R.H., Wawer, M.J., Paxton, L., McNaim, D., Wabwire-Mangen, F., Servadda, D., Li, C., Kiwanuka, N., Hillier, S.L., Rabe, L., Gaydos, C.A., Quinn, T.C., Konde-Lule, J. (1997) HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 350:546-50.
- Simon, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M., Sakacin, G. (2002) a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 6416-6420.
- Skarin, A., Sylwan, J. (1986) Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 94: 399-403.
- Sobel, J.D. (2000) Bacterial vaginosis. *Annu. Rev. Med.* 51:349-356.
- Sobel, J.D., Chaim, W. (1996) Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol.* 34: 2497-2499.
- Sobel J.D. (1997) Vaginitis. *N Engl J Med.* 337:1896-1903.
- Sørensen, K.I., Larsen, R., Kibenich A., Junge, M.P., Johansen, E. (2000) A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1253-1258.
- Spelaung, S.R., S.K. Harlander. (1989) Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52: 856-862.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their

current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36(1): 1-29.

Sweet, R.L. (2000) Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. Infect Dis Obstet Gynecol. 8:184–90.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamker, L.W. (1976) Bacteriocin of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

Tharmaraj, N., Shah, N.P. (2003) Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. J. Dairy Sci. 86(7): 2288-2296.

Tichaczek, P.S., Vogel, R.F., Hammes, W.P. (1993) Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. Arch. Microbiol. 160(4):279-283.

T.L. Talarico, W.J. Dobrogosz. (1989) Chemical Characterization of Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*, Antimicrob. agents chemother. 674-679.

Tomas, M.S., Bru, E., Nader-Macias, M.E. (2003) Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. Am J Obstet Gynecol. 188:35-44.

Tomás, M.S.J., Bru, E., Wiese, B., de Ruiz Holgado, A.A.P., Nader- Macias, M.E. (2002) Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. J. Appl. Microbiol. 93: 714-724.

Ulrich, R.L., Hughes, T.A. (2001) Cloning and expression analysis of the 28 kDa protein from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* ATCC 4797 hypothesized to influence lactacin B production. J. Appl. Microbiol. 91(6): 1067-1073.

Vandenbergh, P.A. (1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 12: 221-228.

Van Reenen, C.A., Dicks, L.M., Chikindas, M.L. (1998) Isolation,

purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 84(6): 1131-1137.

Velraeds, M.C., Van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.J. (1996) Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1958-1963.

Vercruysse, L., D. Gelman, S. Van de Velde, E. Raes, B. Hooghe, V. Vermeirssen, J. Van Camp, G. Smagghe. (2005) ACE Inhibitor Captopril Reduces Ecdysteroids and Oviposition in Moths. Ann NY Acad Sci. 1040, 498-500.

Vigolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M.N., de Ruiz Holgado, A.A.P., Oliver, G. (1996) Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. Int. J. Food Microbiol. 29: 397-402.

World Health Organization. (1995). An overview of selected curable sexually transmitted diseases. In. *Global Program on AIDS*, p. 2-27.

Ya, W., Reifer, C., Miller, L.E. (2010) Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Am J Obstet Gynecol. 203(2): 120.e1-120.e6.

Zielske, J.V., Lohr, K.N., Brook, R.H., Goldberg, G.A. (1981) Conceptualization and measurement of physiologic health for adults. Urinary tract infection. R2262/16-HHS. Santa Monica, CA: The Rand Corporation,. (ISBN no. 0-8330-0275-9)

表一、篩選出的陰道乳酸菌種菌種及株數

代號	菌種	生物膜	H ₂ O ₂ 強度	乳酸強度
Luc2	<i>L.fermentum</i>	+	-	++
Luc7	<i>L.plantarum</i>	+	+	++
Luc11	<i>L.plantarum</i>	+++	+	+++
Luc15	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	+++
Luc16	<i>L.plantarum</i>	+	++	+++
Luc17	<i>L.reuteri</i>	++	++	+++
Luc18	<i>L.plantarum</i>	+	+	++
Luc20	<i>L.casei</i>	+++	++	++
Luc22	<i>L.plantarum</i>	++	+	++
Luc30	<i>L.plantarum</i>	++	+++	+++
Luc33	<i>L.plantarum</i>	++	-	+++
Luc36	<i>L.plantarum</i>	++	+++	+++
Luc37	<i>L.plantarum</i>	++	+++	+++
Luc38	<i>L.plantarum</i>	+++	+	++
Luc39	<i>L.plantarum</i>	+++	++	++
Luc49	<i>L.acidophilus</i>	+	+	+/-
Luc50	<i>L.gasseri</i>	++	-	+/-

Luc51	<i>L.plantarum</i>	+++	++	++
Luc52	<i>L.vaginalis</i>	++	+	++
Luc53	<i>L.vaginalis</i>	+	+	+/-
Luc54	<i>L.casei</i>	+++	+	+++
Luc57	<i>L.vaginalis</i>	+	+	+/-
Luc59	<i>L.gasseri</i>	+	++	+
Luc61	<i>L.gasseri</i>	+	-	+/-
Luc62	<i>L.gasseri</i>	+	+	++
Luc63	<i>L.gasseri</i>	+	-	+++
Luc65	<i>L.plantarum</i>	+	++	++
Luc66	<i>L.plantarum</i>	++	++	++
Luc67	<i>L.plantarum</i>	+	++	+++
Luc68	<i>L.plantarum</i>	+	+	+++
Luc69	<i>L.plantarum</i>	++	++	++
Luc70	<i>L.reuteri</i>	++	++	+
Luc71	<i>L.reuteri</i>	++	++	++
Luc72	<i>L.plantarum</i>	++	+	++
Luc73	<i>L.casei</i>	++	-	++
Luc74	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	++

Luc75	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	++
Luc76	<i>L.reuteri</i>	+++	+	+
Luc77	<i>L.plantarum</i>	++	+	++
Luc79	<i>L.plantarum</i>	+++	+	++
Luc80	<i>L.plantarum</i>	++	-	++
Luc81	<i>L.johnsonii</i>	+++	+	++
Luc82	<i>L.plantarum</i>	++	++	+++
Luc83	<i>L.casei</i>	+	-	+/-
Luc85	<i>L.casei</i>	++	+	+++
Luc86	<i>L.reuteri</i>	++	-	++
Luc87	<i>L.plantarum</i>	++	-	++
Luc88	<i>L.acidophilus</i>	+	-	+/-
Luc89	<i>L.gasseri</i>	++	+	+
Luc90	<i>L.gasseri</i>	+	+	+/-
Luc91	<i>L.gasseri</i>	++	+	++
Luc92	<i>L.reuteri</i>	+	-	+++
Luc93	<i>L.plantarum</i>	+	+	+++
Luc95	<i>L.casei</i>	++	+	+++
Luc96	<i>L.rhamnosus</i>	++	++	++

Luc97	<i>L.casei</i>	+	-	++
Luc98	<i>L.plantarum</i>	+	-	++
Luc99	<i>L.gasseri</i>	+	+	+
Luc101	<i>L.fermentum</i>	++	+++	+
Luc102	<i>L.fermentum</i>	+	-	+/-
Luc103	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	+++
Luc104	<i>L.casei</i>	+	-	++
Luc105	<i>L.rhamnosus</i>	++	++	++
Luc107	<i>L.casei</i>	+	+	++
Luc108	<i>L.casei</i>	+	+	++
Luc109	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	+++
Luc110	<i>L.fermentum</i>	+	+	++
Luc111	<i>L.rhamnosus</i>	++	++	+++
Luc112	<i>L.plantarum</i>	+	-	++
Luc113	<i>L.fermentum</i>	+	-	+/-
Luc114	<i>L.casei</i>	++	+	+++
Luc115	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	++
Luc117	<i>L.casei</i>	++	+++	++
Luc119	<i>L.fermentum</i>	+	-	+/-

Luc120	<i>L.rhamnosus</i>	++	+	++
Luc122	<i>L.casei</i>	++	+	++
Luc123	<i>L.casei</i>	++	-	+++
Luc125	<i>L.plantarum</i>	+	+	+++
Luc127	<i>L.rhamnosus</i>	+	++	++
Luc128	<i>L.plantarum</i>	+	+	+++
Lyc518	<i>L.reuteri</i>	++	++	++
Lyc519	<i>L.reuteri</i>	++	++	++

表二、酸度

代號	菌種	pH值	酸度
Luc2	<i>L.fermentum</i>	4.44	0.072%
Luc7	<i>L.plantarum</i>	4.60	0.063%
Luc11	<i>L.plantarum</i>	4.05	0.108%
Luc15	<i>L.rhamnosus</i>	3.77	0.144%
Luc16	<i>L.plantarum</i>	3.79	0.153%
Luc17	<i>L.reuteri</i>	4.10	0.117%
Luc18	<i>L.plantarum</i>	3.71	0.162%
Luc20	<i>L.casei</i>	3.90	0.126%
Luc22	<i>L.plantarum</i>	3.82	0.153%
Luc30	<i>L.plantarum</i>	3.77	0.171%
Luc33	<i>L.plantarum</i>	3.73	0.180%
Luc36	<i>L.plantarum</i>	3.82	0.162%
Luc37	<i>L.plantarum</i>	3.82	0.162%

Luc38	<i>L.plantarum</i>	3.75	0.198%
Luc39	<i>L.plantarum</i>	3.73	0.198%
Luc49	<i>L.acidophilus</i>	4.11	0.126%
Luc50	<i>L.gasseri</i>	4.02	0.126%
Luc51	<i>L.plantarum</i>	3.79	0.153%
Luc52	<i>L.vaginalis</i>	4.18	0.108%
Luc53	<i>L.vaginalis</i>	4.26	0.099%
Luc54	<i>L.casei</i>	3.85	0.135%
Luc57	<i>L.vaginalis</i>	4.14	0.117%
Luc59	<i>L.gasseri</i>	3.72	0.171%
Luc61	<i>L.gasseri</i>	3.89	0.144%
Luc62	<i>L.gasseri</i>	3.89	0.153%
Luc63	<i>L.gasseri</i>	3.83	0.162%
Luc65	<i>L.plantarum</i>	3.79	0.171%
Luc66	<i>L.plantarum</i>	3.81	0.171%

Luc67	<i>L.plantarum</i>	3.75	0.180%
Luc68	<i>L.plantarum</i>	3.86	0.162%
Luc69	<i>L.plantarum</i>	3.74	0.162%
Luc70	<i>L.reuteri</i>	4.07	0.117%
Luc71	<i>L.reuteri</i>	4.01	0.126%
Luc72	<i>L.plantarum</i>	3.75	0.153%
Luc73	<i>L.casei</i>	3.80	0.144%
Luc74	<i>L.rhamnosus</i>	3.86	0.144%
Luc75	<i>L.rhamnosus</i>	3.87	0.126%
Luc76	<i>L.reuteri</i>	4.05	0.117%
Luc77	<i>L.plantarum</i>	3.71	0.171%
Luc79	<i>L.plantarum</i>	3.75	0.153%
Luc80	<i>L.plantarum</i>	3.75	0.162%
Luc81	<i>L.johnsonii</i>	4.88	0.045%
Luc82	<i>L.plantarum</i>	3.80	0.162%

Luc83	<i>L.casei</i>	3.86	0.144%
Luc85	<i>L.casei</i>	3.88	0.144%
Luc86	<i>L.reuteri</i>	4.47	0.072%
Luc87	<i>L.plantarum</i>	4.60	0.063%
Luc88	<i>L.acidophilus</i>	4.03	0.126%
Luc89	<i>L.gasseri</i>	4.07	0.117%
Luc90	<i>L.gasseri</i>	4.12	0.108%
Luc91	<i>L.gasseri</i>	3.79	0.153%
Luc92	<i>L.reuteri</i>	4.38	0.081%
Luc93	<i>L.plantarum</i>	3.77	0.171%
Luc95	<i>L.casei</i>	3.86	0.144%
Luc96	<i>L.rhamnosus</i>	3.88	0.144%
Luc97	<i>L.casei</i>	3.70	0.180%
Luc98	<i>L.plantarum</i>	3.74	0.171%
Luc99	<i>L.gasseri</i>	4.13	0.117%

Luc101	<i>L.fermentum</i>	4.17	0.117%
Luc102	<i>L.fermentum</i>	4.13	0.117%
Luc103	<i>L.rhamnosus</i>	3.75	0.171%
Luc104	<i>L.casei</i>	4.06	0.108%
Luc105	<i>L.rhamnosus</i>	3.83	0.153%
Luc107	<i>L.casei</i>	3.98	0.126%
Luc108	<i>L.casei</i>	3.71	0.171%
Luc109	<i>L.rhamnosus</i>	3.83	0.153%
Luc110	<i>L.fermentum</i>	4.16	0.126%
Luc111	<i>L.rhamnosus</i>	3.68	0.162%
Luc112	<i>L.plantarum</i>	3.81	0.171%
Luc113	<i>L.fermentum</i>	4.09	0.117%
Luc114	<i>L.casei</i>	3.86	0.144%
Luc115	<i>L.rhamnosus</i>	3.87	0.144%
Luc117	<i>L.casei</i>	3.71	0.171%

Luc119	<i>L.fermentum</i>	4.05	0.135%
Luc120	<i>L.rhamnosus</i>	3.84	0.144%
Luc122	<i>L.casei</i>	3.74	0.162%
Luc123	<i>L.casei</i>	3.92	0.135%
Luc125	<i>L.plantarum</i>	3.87	0.153%
Luc127	<i>L.rhamnosus</i>	3.96	0.126%
Luc128	<i>L.plantarum</i>	3.84	0.162%
Lyc518	<i>L.reuteri</i>	4.01	0.126%
Lyc519	<i>L.reuteri</i>	4.07	0.117%

表三、抑菌圈大小

代號	菌種	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Luc2	<i>L.fermentum</i>	-	-	-
Luc7	<i>L.plantarum</i>	-	-	-
Luc11	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	不明顯
Luc15	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.2	1.2
Luc16	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	1.1
Luc17	<i>L.reuteri</i>	不明顯	-	1.2
Luc18	<i>L.plantarum</i>	-	-	不明顯
Luc20	<i>L.casei</i>	-	-	1.0
Luc22	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.0
Luc30	<i>L.plantarum</i>	-	不明顯	1.2
Luc33	<i>L.plantarum</i>	-	-	1.0
Luc36	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	1.1
Luc37	<i>L.plantarum</i>	-	不明顯	1.1
Luc38	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.0
Luc39	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	1.0

Luc49	<i>L.acidophilus</i>	-	-	-
Luc50	<i>L.gasseri</i>	-	-	-
Luc51	<i>L.plantarum</i>	-	-	1.1
Luc52	<i>L.vaginalis</i>	-	-	不明顯
Luc53	<i>L.vaginalis</i>	-	-	-
Luc54	<i>L.casei</i>	-	1.1	1.0
Luc57	<i>L.vaginalis</i>	-	-	-
Luc59	<i>L.gasseri</i>	-	1.0	1.0
Luc61	<i>L.gasseri</i>	-	-	1.0
Luc62	<i>L.gasseri</i>	-	1.0	1.0
Luc63	<i>L.gasseri</i>	-	1.1	1.0
Luc65	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.1
Luc66	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	不明顯
Luc67	<i>L.plantarum</i>	-	不明顯	1.0
Luc68	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.2
Luc69	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	1.1
Luc70	<i>L.reuteri</i>	-	-	1.0
Luc71	<i>L.reuteri</i>	1.6	1.1	-

Luc72	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	1.1
Luc73	<i>L.casei</i>	-	1.0	1.0
Luc74	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	外2.0内1.3
Luc75	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	外2.0内1.3
Luc76	<i>L.reuteri</i>	-	-	1.0
Luc77	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	不明顯
Luc79	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	1.0
Luc80	<i>L.plantarum</i>	-	1.1	不明顯
Luc81	<i>L.johnsonii</i>	-	-	-
Luc82	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.1
Luc83	<i>L.casei</i>	-	1.0	1.2
Luc85	<i>L.casei</i>	-	1.1	1.2
Luc86	<i>L.reuteri</i>	-	-	不明顯
Luc87	<i>L.plantarum</i>	-	-	不明顯
Luc88	<i>L.acidophilus</i>	-	-	1.1
Luc89	<i>L.gasseri</i>	-	-	1.0
Luc90	<i>L.gasseri</i>	-	-	1.0
Luc91	<i>L.gasseri</i>	-	-	1.1

Luc92	<i>L.reuteri</i>	-	-	-
Luc93	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.1
Luc95	<i>L.casei</i>	-	1.0	1.2
Luc96	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	1.1
Luc97	<i>L.casei</i>	-	-	1.1
Luc98	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.1
Luc99	<i>L.gasseri</i>	-	-	-
Luc101	<i>L.fermentum</i>	-	1.0	-
Luc102	<i>L.fermentum</i>	-	-	-
Luc103	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	1.1
Luc104	<i>L.casei</i>	-	1.1	1.1
Luc105	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.1	外1.6内1.1
Luc107	<i>L.casei</i>	-	1.0	1.2
Luc108	<i>L.casei</i>	-	不明顯	1.2
Luc109	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	1.0
Luc110	<i>L.fermentum</i>	-	-	1.0
Luc111	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.1	1.1
Luc112	<i>L.plantarum</i>	-	-	-
Luc113	<i>L.fermentum</i>	-	-	-

Luc114	<i>L.casei</i>	-	1.1	1.1
Luc115	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	1.1
Luc117	<i>L.casei</i>	-	1.1	不明顯
Luc119	<i>L.fermentum</i>	-	-	不明顯
Luc120	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.0	1.1
Luc122	<i>L.casei</i>	-	不明顯	1.1
Luc123	<i>L.casei</i>	-	1.0	1.1
Luc125	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	1.2
Luc127	<i>L.rhamnosus</i>	-	1.1	1.2
Luc128	<i>L.plantarum</i>	-	1.0	不明顯
Lyc518	<i>L.reuteri</i>	不明顯	1.1	-
Lyc519	<i>L.reuteri</i>	-	不明顯	不明顯

表四、各種陰道炎分泌物所呈現特徵比較表

特徵	生理性分泌物	念珠菌感染	滴蟲感染	細菌感染	萎縮性陰道炎
顏色	透明到白色	白色	黃到黃綠色	白到灰色	-
氣味	無臭	無臭	惡臭	魚腥味	-
型態	棉絮狀 Floccular	棉絮狀 Floccular	稀薄成水狀 Homogeneous	稀薄成水狀 Homogeneous	-
黏稠度	高	高	低	低	低
PH值	≤ 4.5	4-4.5	5-6.0	>4.5	>6.0
其他	-	厚、乾酪狀 curdlike	泡沫狀	薄	分泌物稀少

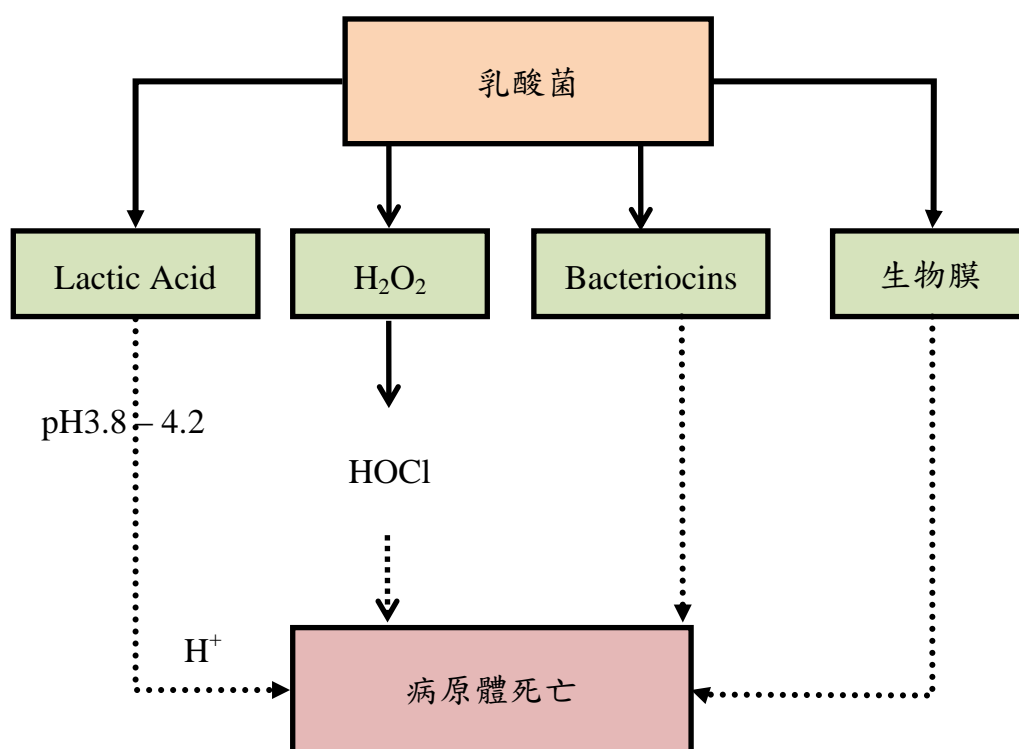


圖 1-1、乳酸菌抑制致病菌生長過程

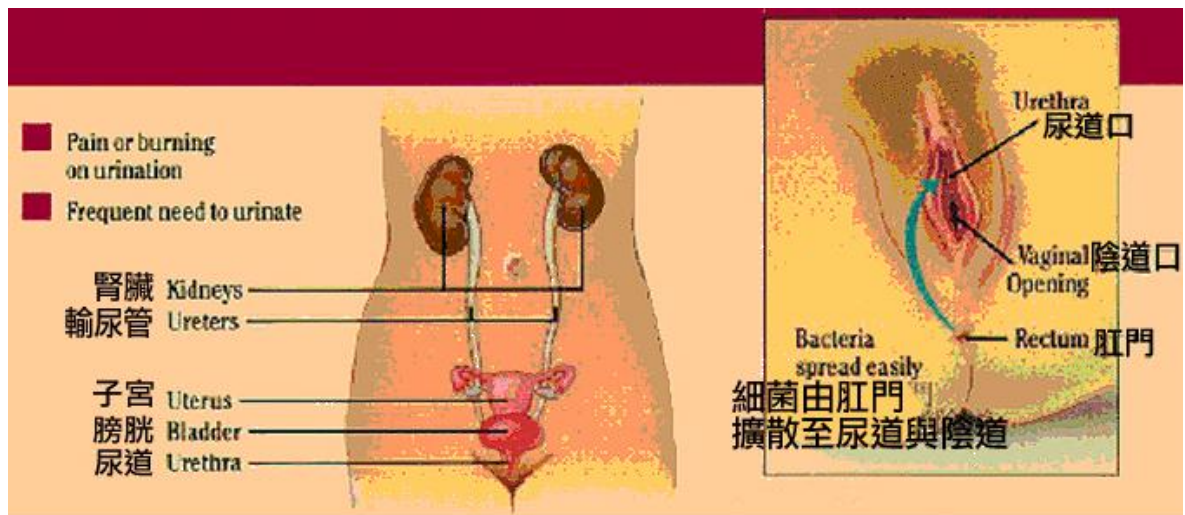
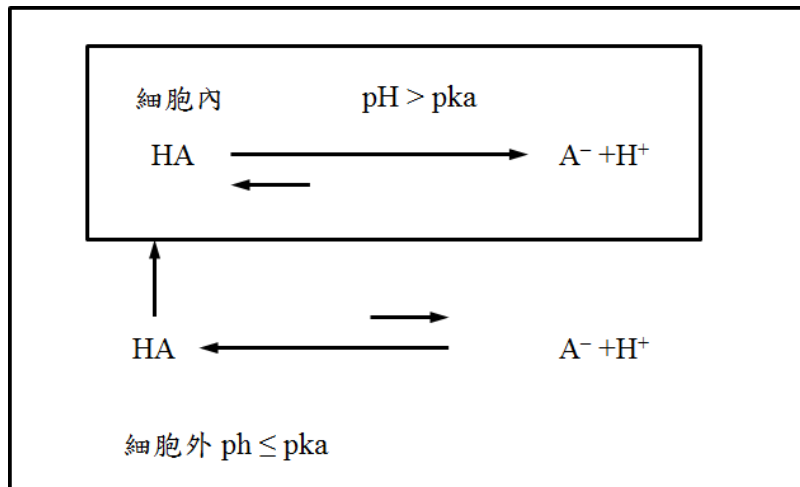


圖2-1、女性生殖系統



(Baired-Paker, 1980)

圖 2-2、有機酸之抑菌機制

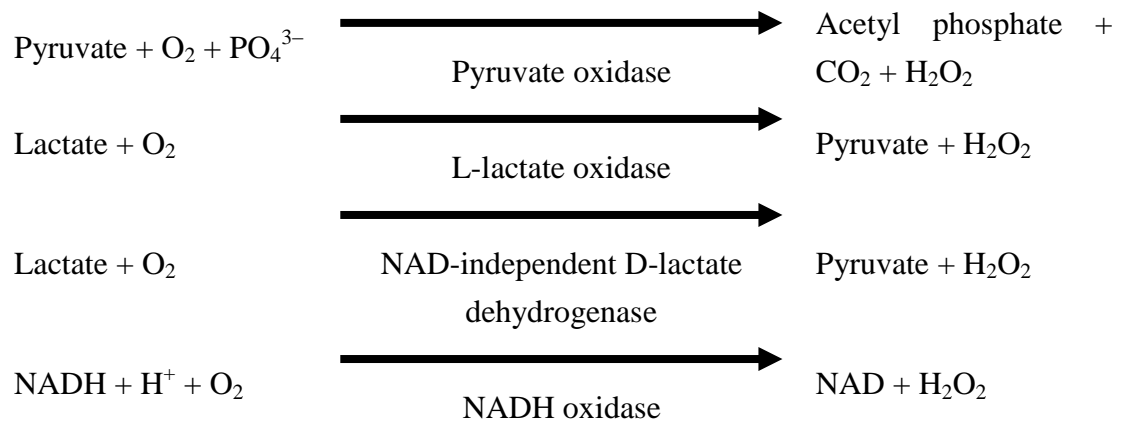
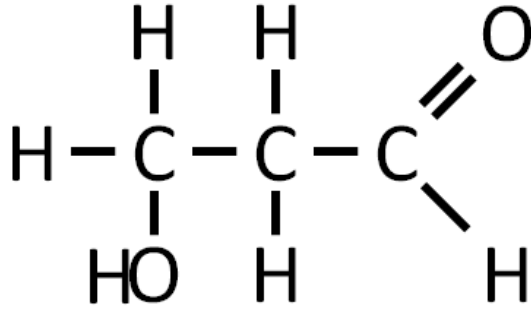
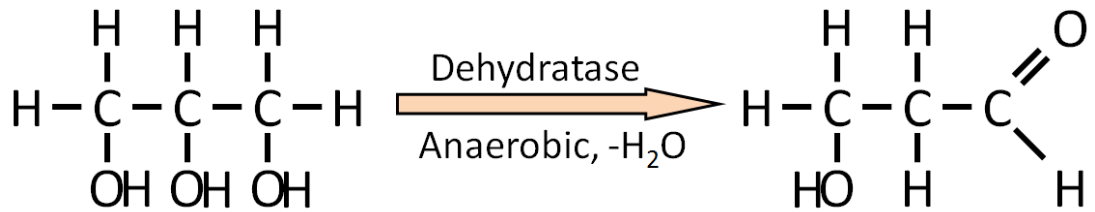


圖 2-3、乳酸菌產生過氧化氫之反應機制



(a) Reuterin 的分子結構式



(b) L. reuterin 在厭氧的狀態下代謝 glycerol 產生 reuterin

圖 2-4、分子結構式

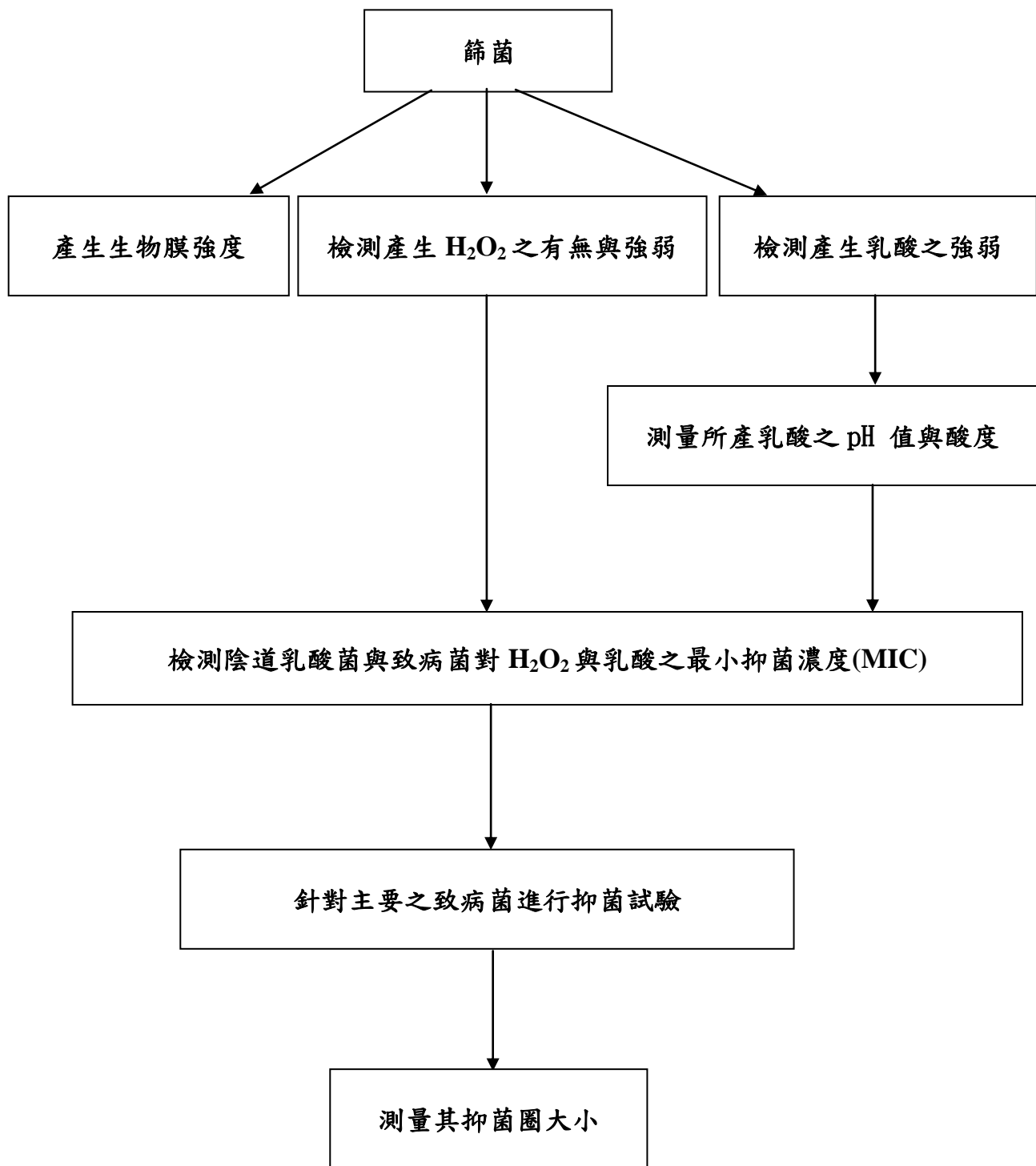


圖 3-1、實驗流程



(a)

+++



(b)

++

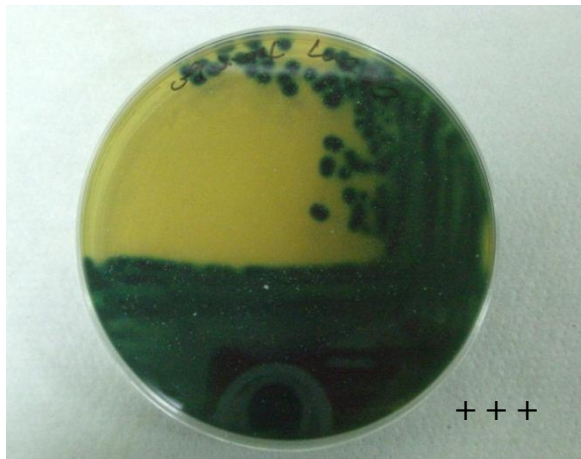


(c)

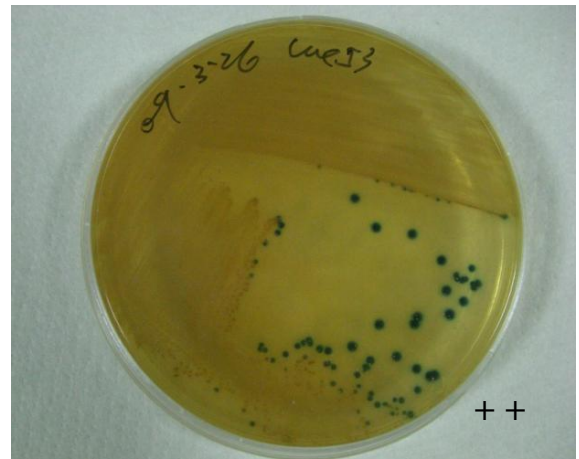
+

圖3-2、觀察附著在乳酸菌生物膜的酚紅指示劑得知陰道乳酸菌產生生物膜的強度

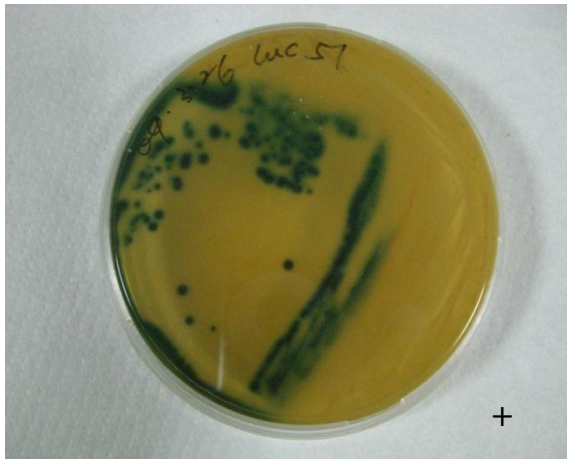
(a)+++ :強 (b)++ :中強 (c)+ :弱



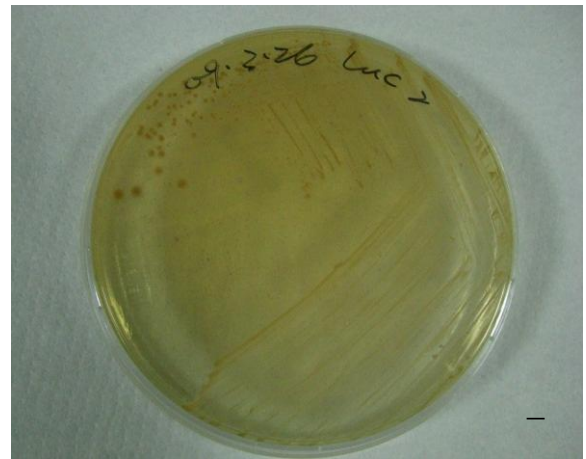
(a)



(c)



(b)



(d)

圖3-3、利用TMB和酵素 (HRPO)會與乳酸菌所產生的 H_2O_2 生成藍色反應，以利觀察乳酸菌所產生的 H_2O_2 的多寡

(a)+++ :強 (b)++ :中強 (c)+ :弱 (d)- :無



(a)



(b)



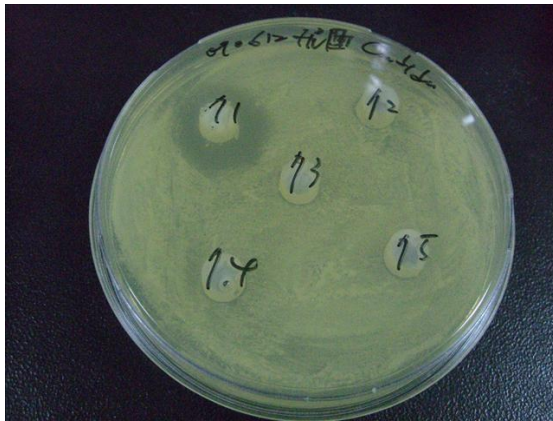
(c)



(d)

圖3-4、觀察陰道乳酸菌產生的透明圈得知乳酸的強弱之分

(a)+++ :強 (b)++ :中強 (c)+ :弱 (d)+/- :不明顯



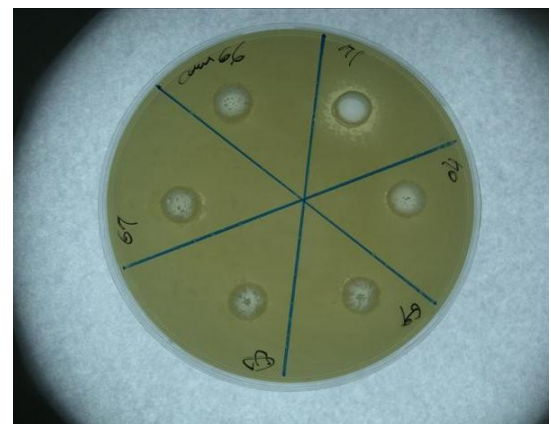
(a)



(b)



(c)



(d)

圖3-5、本實驗室篩出的陰道乳酸菌針對*Candida albicans*試驗

發現Luc71菌株有明顯的抑菌能力。



(a)



(b)



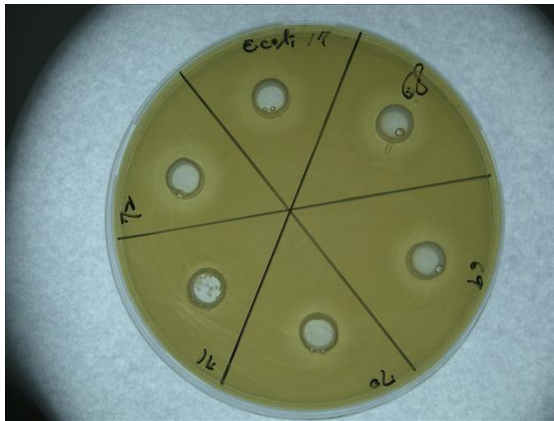
(c)



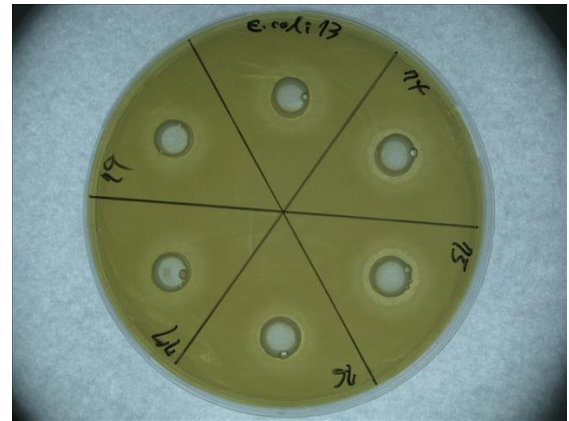
(d)

圖3-6、本實驗室篩出的陰道乳酸菌針對*Gardnerella vaginalis*試驗

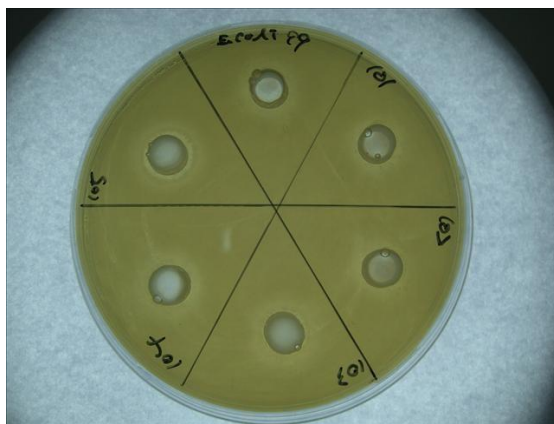
清楚辨別有無抑菌的能力，Luc71菌株也有明顯的抑制能力。



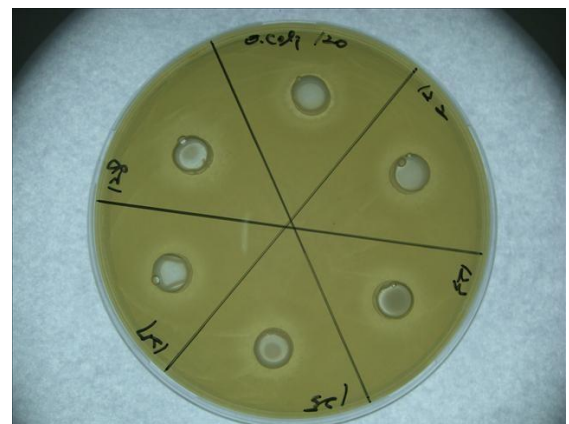
(a)



(b)



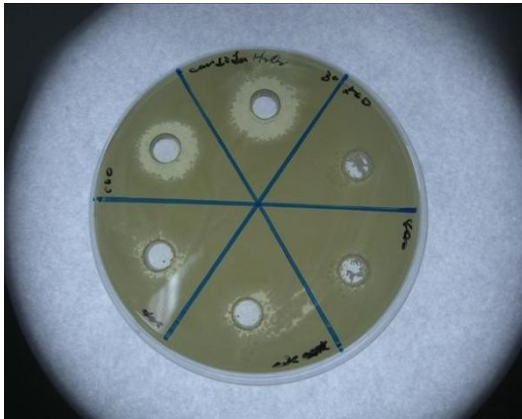
(c)



(d)

圖3-7、本實驗室篩出的陰道乳酸菌針對*Escherichia coli*試驗

發現*Lactobacillus rhamnosus*菌種抑制效果最好(Luc 74 Luc 75 Luc 105)。



(a)

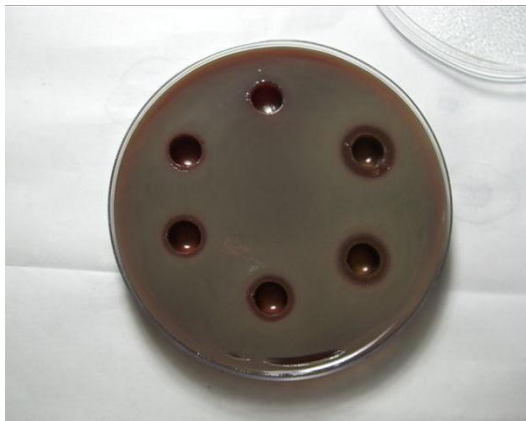


(b)

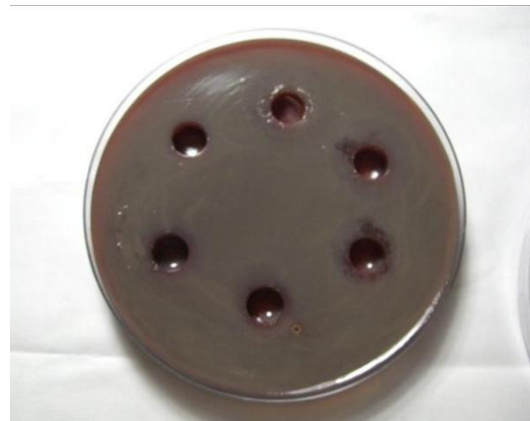
圖3-8、MIC (最小抑菌濃度) 試驗

(a)為 H_2O_2 對*Candida albicans*的最小耐受性試驗

(b)為乳酸對*Candida albicans*的最小耐受性試驗



(a)

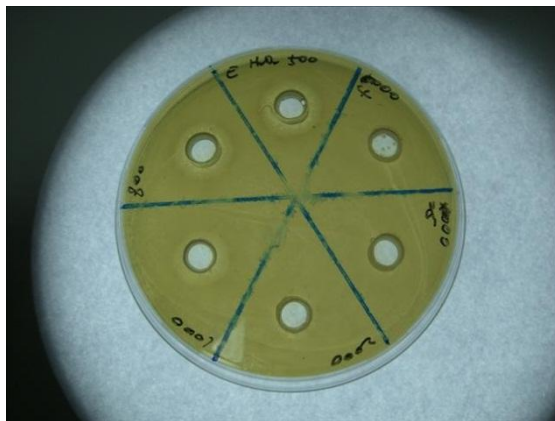


(b)

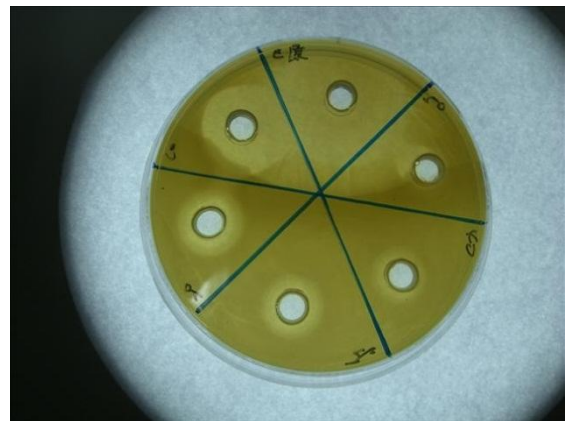
圖3-9、MIC (最小抑菌濃度) 試驗

(a)為 H_2O_2 對*Gardnerella vaginalis*的最小耐受性試驗

(b)為乳酸對*Gardnerella vaginalis*的最小耐受性試驗



(a)



(b)

圖3-10、MIC (最小抑菌濃度) 試驗

(a)為 H_2O_2 對*Escherichia coli*的最小耐受性試驗

(b)為乳酸對*Escherichia coli*的最小耐受性試驗